

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
KIM LEBLANC**

**L'IMPACT DES TRAITEMENTS DES CANCERS DU SEIN PAR LES ANTI-
ESTROGÈNES : EFFETS SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES
CANCÉREUSES UTÉRINES**

AVRIL 2006

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

D'abord, je désire remercier mon directeur de recherche, le Dr Éric Asselin, qui m'a fait découvrir l'univers de la recherche. De plus, il m'a permis de participer à des congrès internationaux de grande renommée, qui furent des expériences très enrichissantes tant sur le plan scientifique que professionnel. Notons que sa grande disponibilité fût aussi particulièrement appréciée. Merci beaucoup.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement tous mes collègues au laboratoire pour leur dynamisme et leur esprit d'équipe. Plus particulièrement, je voudrais remercier Sophie Parent, pour son aide apportée en réponse à toutes mes questions, Émilie Sexton, pour son aide quotidienne tant technique qu'amicale, Véronique Gagnon, pour ses compétences et son amitié, Marie-Claude Déry, pour ses connaissances générales inégalées et son amitié, Céline Vanthemsche, pour son expertise et ses aptitudes en enseignement et finalement, Virginie Boucher, pour son aide technique et son humour.

Finalement, merci à toute ma famille. Mon conjoint qui fût très compréhensif et qui a eu confiance en moi. Mon père pour son intérêt et ses judicieux conseils. Ma mère qui a su m'encourager tout au long de mon cheminement. Ma sœur qui s'est intéressé à mes recherches. Mon filleul qui m'a offert des moments magiques.

À la mémoire de Lise Leblanc.

RÉSUMÉ

Depuis quelques décennies, plusieurs anti-estrogènes ont fait, et font encore aujourd'hui, leur apparition sur le marché pour le traitement de pathologies en lien avec les estrogènes. Le tamoxifène, dont l'utilisation fût l'un des premiers pas dans le traitement par les anti-estrogènes, est un médicament très efficace contre le cancer du sein. Suite à la découverte du tamoxifène, d'autres anti-estrogènes ont été développés dont le raloxifène, utilisé contre l'ostéoporose, et le ICI 182 780, utilisé contre les cancers du sein plus avancés. Avec le temps, on s'est aperçu que l'utilisation à long terme du tamoxifène favorisait le développement d'un cancer de l'utérus alors que ce n'est pas le cas avec d'autres anti-estrogènes comme le raloxifène et le ICI 182 780. Ainsi, l'objectif de cette étude est de déterminer les effets du tamoxifène, du raloxifène et du ICI 182 780 au niveau de six lignées cancéreuses de l'utérus afin d'en faire la comparaison et donc d'augmenter notre compréhension du mécanisme d'action des anti-estrogènes. De plus, nous avons opté pour faire nos manipulations sous deux types de conditions de culture cellulaire afin de vérifier si la présence et l'absence d'estrogènes dans le milieu de culture pourrait influencer les résultats. Nous avons déterminé l'expression en ARNm par RT-PCR et en protéines par Western blot des gènes du récepteur à l'estrogène nucléaire ($ER\alpha$ et $ER\beta$), d'un nouveau récepteur à l'estrogène membranaire, le GPR30, et du répresseur de l'activité du récepteur à l'estrogène (REA) qui pourraient être impliqués dans le mécanisme d'action des anti-estrogènes. Nous avons aussi vérifié si la présence et l'absence d'estrogènes influençait la phosphorylation/activité de Akt. Nous avons évalué les effets du 17β -oestradiol, du 4-hydroxytamoxifène, du raloxifène et du ICI 182 780 sur six lignées cellulaires

différentes par des tests de prolifération cellulaire au MTT. Finalement, nous avons fait des tests d'affinité de fixation au récepteur à l'estrogène avec les quatre composés nommés précédemment. Nos résultats démontrent que le tamoxifène a un effet agoniste des estrogènes alors que le raloxifène et le ICI 182 780 ont un effet principalement antagoniste des estrogènes au niveau du cancer de l'utérus comme c'est le cas au niveau de l'utérus normal. Nous avons observé l'expression des gènes du ER α , du ER β , du GPR30 et du REA par les lignées cellulaires à l'étude. Il est donc possible que ceux-ci soient impliqués dans le mécanisme d'action des anti-estrogènes que nous avons étudié. Nous avons démontré que la présence et l'absence d'estrogènes dans les conditions de culture cellulaire avait un impact suffisant pour affecter les effets engendrés par les anti-estrogènes sur les six lignées cancéreuses utérines. Notre étude cumulée avec d'autres études sur le mécanisme d'action des anti-estrogènes au niveau du cancer de l'utérus vont accroître notre compréhension du développement d'un cancer de l'utérus suite à un traitement au tamoxifène.

Mots clés : 17 β -oestradiol, 4-hydroxytamoxifène, raloxifène, ICI 182 780, cancer de l'utérus, lignées cellulaires, prolifération cellulaire, récepteur à l'estrogène, rouge de phénol et traitement au charbon-dextran.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE I REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. INTRODUCTION.....	2
1.1 Problématique.....	2
1.2 Les estrogènes	2
1.2.1 Généralités.....	2
1.2.2 La synthèse des estrogènes.....	3
1.2.2.1 La voie de synthèse des estrogènes	3
1.2.2.2 Le site de synthèse des estrogènes	5
1.2.3 Les estrogènes et leurs récepteurs	6
1.2.3.1 Généralités.....	6
1.2.3.2 La structure du récepteur à l'estrogène	6
1.2.3.3 La fonction du récepteur à l'estrogène	7
1.2.3.4 La voie génomique d'action des estrogènes.....	8
1.2.3.4.1 Le mécanisme.....	8
1.2.3.4.2 Les co-régulateurs	9
1.2.3.4.3 Le répresseur de l'activité du récepteur à l'estrogène	10
1.2.3.5 La voie non-génomique d'action des estrogènes.....	11

1.2.3.5.1 Le mécanisme	11
1.2.3.5.2 Le récepteur à l'estrogène membranaire	11
1.2.3.5.3 Le GPR30	12
1.3 L'utérus	13
1.3.1 La physiologie de l'utérus	13
1.3.2 Le cycle menstruel.....	15
1.3.3 La carcinogénèse	16
1.3.3.1 La physiologie d'un tissu sain	16
1.3.3.2 Le développement d'un cancer.....	16
1.3.4 Le cancer de l'utérus	17
1.3.4.1 Généralités.....	17
1.3.4.2 L'histologie	18
1.3.4.3 L'étiologie et les facteurs de risque.....	18
1.3.4.4 Les manifestations et le diagnostic.....	20
1.3.4.5 La stadification	20
1.3.4.6 Les traitements	21
1.4 Les anti-estrogènes	22
1.4.1 Généralités.....	22
1.4.2 Les anti-estrogènes de type 1	22
1.4.3 Les anti-estrogènes de type 2	24
1.5 Les autres sources oestrogéniques.....	25
1.5.1 Généralités.....	25
1.5.2 Le sérum	25
1.5.3 Le rouge de phénol	26

1.6 But de l'étude	27
CHAPITRE II EFFECTS OF 4-HYDROXYTAMOXIFEN, RALOXIFENE AND ICI 182 780 ON CELL PROLIFERATION OF UTERINE CANCER CELL LINES IN THE PRESENCE AND THE ABSENCE OF ESTROGENS....	28
2.1 Préface	29
2.2 Résumé	30
2.3 Abstract	32
2.4 Introduction	32
2.5 Materials and methods.....	35
2.6 Results	39
2.7 Discussion	42
2.8 References list	47
2.9 Figures legends.....	52
2.10 Figures	55
CHAPITRE III CONCLUSIONS GÉNÉRALES	64
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES FUTURES	65
BIBLIOGRAPHIE	76

LISTE DES FIGURES

1.1	Voie de synthèse des estrogènes	4
1.2	Site de synthèse des estrogènes	5
1.3	Structure des deux isoformes du ER	7
1.4	Voie génomique et non-génomique d'action des estrogènes	9
1.5	Anatomie de l'utérus	14
1.6	Cycle de la reproduction chez la femme	14
1.7	Développement d'un cancer	17
1.8	Coupe histologique d'un carcinome endométroïde	18
1.9	Apparition d'un phénotype malin suite à des expositions cumulées aux estrogènes	19
1.10	Structure du 17 β -oestradiol et de trois anti-estrogènes majeurs	23
1.11	Structure du rouge de phénol et de son contaminant	26
2.1	Expression of ER α	55
2.2	Expression of ER β	56
2.3	mRNA abundance of GPR30 and REA	57
2.4	Expression of Akt and phospho-Akt	58
2.5	17 β -estradiol effects on cell proliferation	59
2.6	4-hydroxytamoxifen effects on cell proliferation	60
2.7	Raloxifene effects on cell proliferation	61
2.8	ICI 182 780 effects on cell proliferation	62
2.9	ER α and ER β binding affinity	63

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

α	alpha
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	domaine de transactivation indépendant de l'hormone
AF-2	domaine de transactivation dépendant de l'hormone
ARNm	acide ribonucléique messenger
β	bêta
BGS	sérum de croissance bovin
°C	degré Celcius
CHO	« chinese hamster ovary »
cm ²	centimètre carré
CO ₂	dioxyde de carbone
DBD	domaine de fixation à l'ADN
DC	traitement au charbon-dextran
DHEA	déhydroépiandrostérone
dNTPs	déoxynucléotides triphosphates
dT	déoxythymidine
DTT	dithiothreitol
E ₂	oestradiol, 17 β -oestradiol
EA	enzyme accepteur
ED	enzyme donneur
EFC	« enzyme fragment complementation »
ER α	isoforme α du récepteur à l'estrogène
ER β	isoforme β du récepteur à l'estrogène
ER	récepteur à l'estrogène
ERE	éléments de réponse à l'estrogène
et al.	lorsqu'il y a plus de trois auteurs dans un ouvrage
FBS	sérum fœtal bovin
Fig.	figure

FIGO	Fédération internationale de gynécologie et obstétrique
FSH	hormone folliculostimulante
g	gramme
GPCR	récepteurs couplés à une protéine G
h	heure
HCl	acide chlorydrique
HRP	« horse radish peroxydase »
IC ₅₀	concentration inhibitrice 50%
kDa	kiloDalton
L	litre
LBD	domaine de fixation au ligand
LDL	lipoprotéines de faible densité
LH	hormone lutéinisante
M	molaire
MAPK	« mitogen-actived protein kinase »
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mM	millimolaire
MMLV-RT	« muloney murine leukemia virus reverse transcriptase »
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
nm	nanomètre
OD	densité optique
PAGE	gel de polyacrylamide pour électrophorèse
pb	paire de bases
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de la polymérase en chaîne
PI 3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
protéines G	protéines transductrices de signaux par fixation du nucléotide guanine

REA	Répresseur de l'activité du récepteur à l'estrogène
RT	température pièce
RT-PCR	« reverse transcriptase–polymerase chain reaction »
s	seconde
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SEM	erreur standard de la moyenne
SERMs	modulateurs sélectifs du récepteur à l'estrogène
siRNA	« small interference RNA »
STAR	« study of tamoxifen and raloxifen »
Taq	Thermus aquaticus
U	unité
µg	microgramme
µL	microlitre
µM	micromolaire
V	volt
%	pourcentage

CHAPITRE I
REVUE DE LITTÉRATURE

INTRODUCTION

1.1 Problématique

Les estrogènes possèdent des propriétés qui favorisent la prolifération cellulaire de leurs cellules cibles et qui peuvent mener à l'induction de certaines pathologies dont les cancers du sein et de l'utérus. Un engouement pour le développement de composés contrant les effets des estrogènes a conduit à l'apparition de composés appelés anti-estrogènes. L'un des premiers anti-estrogènes à avoir été développé est le tamoxifène. Celui-ci a été approuvé pour la prévention et le traitement du cancer du sein (Fisher et al. 1998; MacGregor et Jordan 1998; Taylor et Taguchi 2005; Ugwumadu et al. 1998). Avec le temps, il a prouvé sa grande efficacité contre ce cancer alors que l'on a découvert qu'il favorisait le développement d'un cancer de l'utérus chez certaines femmes qui l'utilisaient (Fisher et al. 1994; Fornander et al. 1989). Étrangement, d'autres anti-estrogènes mis sur le marché suite au tamoxifène, comme le raloxifène et le ICI 182 780, n'ont pas présenté d'effets favorisant le cancer de l'utérus. Comme l'incidence du cancer du sein est très importante de nos jours, l'administration du tamoxifène pour sa prévention et son traitement contribue au maintien d'une incidence élevée du cancer de l'utérus. Ainsi, il faut à tout prix augmenter la compréhension du mécanisme d'action du tamoxifène et des autres anti-estrogènes au niveau du cancer de l'utérus afin de pouvoir un jour développer des stratégies pour empêcher l'action du tamoxifène dans le développement de ce cancer.

1.2 Les estrogènes

1.2.1 Généralités

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes sécrétées en majeure partie par les ovaires chez la femme. Ils veillent principalement chez la femme au développement et au maintien des structures de l'appareil reproducteur, des seins et des caractères sexuels secondaires, c'est-à-dire la répartition du tissu adipeux, le ton de la voix, l'élargissement

du bassin et le mode de croissance des cheveux et des poils (Tortora et Grabowski 2001). Chez l'homme, il existe une synthèse des estrogènes au niveau des testicules. Ils jouent un rôle dans le développement et le maintien du tractus urogénital de l'homme (Nilsson et al. 2001). Une production très faible d'estrogènes, tant chez l'homme que chez la femme, s'effectue au niveau des corticosurrénales correspondant à un sous-produit de la synthèse des corticostéroïdes qui a lieu dans cette partie des surrénales (Heffner 2003).

1.2.2 La synthèse des estrogènes

1.2.2.1 La voie de synthèse des estrogènes

Le cholestérol est le précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes. Il est lui-même synthétisé à partir de l'acétate. Le cholestérol subit plusieurs réactions enzymatiques pour permettre la synthèse des estrogènes (Fig.1.1) (Heffner 2003). D'abord, le cholestérol est transformé en pregnénolone par une enzyme de clivage latéral. La pregnénolone nouvellement formée peut subir des transformations selon deux voies : soit la voie de la progestérone par l'enzyme 3β -hydroxystéroïde déhydrogénase ou la voie de la 17α -hydroxypregnenolone par l'enzyme 17α -hydroxylase. Si la pregnénolone est transformée en progestérone, elle sera ensuite soumise à l'enzyme 17α -hydroxylase pour former la 17α -hydroxyprogestérone, et ensuite être transformée en androstènedione par l'enzyme ligase. L'androstènedione nouvellement synthétisée peut-être transformée en testostérone par la 17β -hydroxystéroïde déhydrogénase. Par contre, si la pregnénolone est transformée en 17α -hydroxypregnenolone, celle-ci pourra former la 17α -hydroxyprogestérone grâce à l'enzyme 3β -hydroxystéroïde déhydrogénase. La 17α -hydroxypregnenolone pourra suivre les étapes de la voie de la progestérone ou encore, former directement la déhydroépiandrostérone (DHEA) par la ligase. La DHEA peut former l'androstènediol grâce à la 17β -hydroxystéroïde déhydrogénase. La DHEA et l'androstènediol peuvent, par la suite, former, grâce à l'enzyme 3β -hydroxystéroïde déhydrogénase, l'androstènedione et la testostérone respectivement (Heffner 2003).

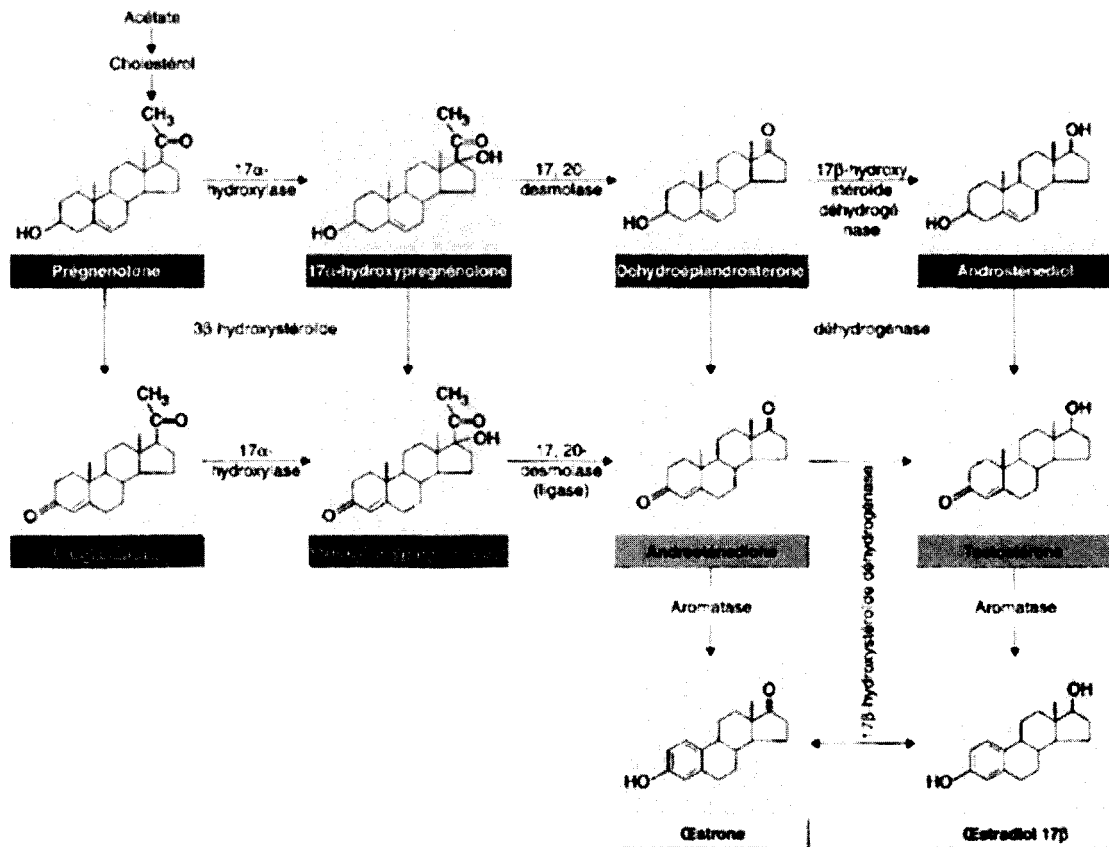


FIGURE 1.1 : Voie de synthèse des estrogènes adapté de Johnson,M.H. et Everitt,B.J.
"Reproduction", traduction de la 5^e édition anglaise, De Boeck Université, Paris : 298
pages (2002).

L'androstènedione et la testostérone doivent être soumises à l'action de l'enzyme aromatase pour former les estrogènes; l'androstènedione formera l'oestrone et la testostérone, l'oestradiol. L'oestrone peut, par le biais de la 17β-hydroxystéroïde déhydrogénase, former l'oestradiol et la réaction inverse peut aussi s'effectuer. L'oestradiol est le principal estrogène à être produit par les ovaires. Il peut aussi être appelé 17β-oestradiol et son abréviation est E₂. Notons que l'oestrone, aussi synthétisé par les ovaires, et l'oestriol, d'origine périphérique et placentaire, sont des estrogènes à activité plus faible que l'oestradiol retrouvés chez la femme (Heffner 2003).

1.2.2.2 Le site de synthèse des estrogènes

La synthèse d'estrogènes, au niveau de l'ovaire, est sous la gouverne de deux gonadotrophines produites par l'hypophyse antérieure : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH). La collaboration entre les deux types cellulaires du follicule est nécessaire pour effectuer cette synthèse : les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa (Fig.1.2) (Heffner 2003).

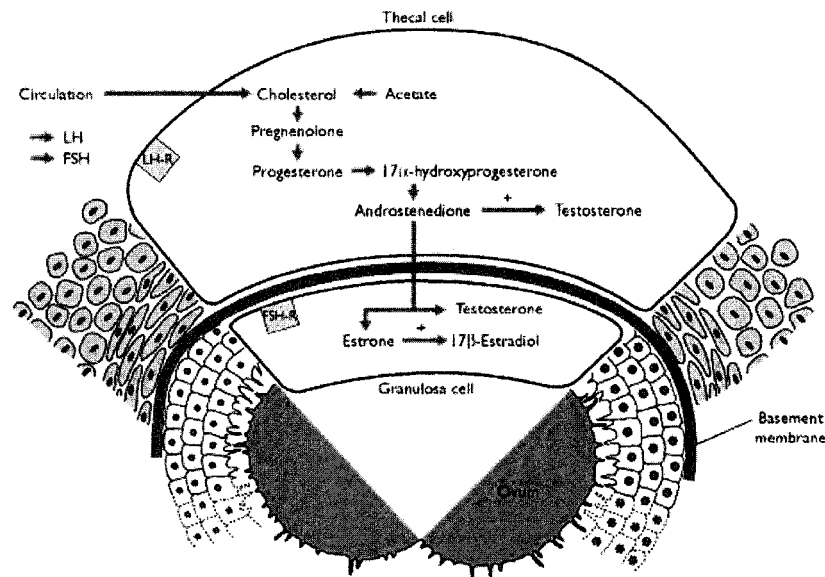


FIGURE 1.2 : Site de synthèse des estrogènes adapté de Nussey,S.S. et Whitehead,S.A.
"Endocrinology : an integrated approach", 1^{ère} édition, BIOS Scientific Publishers,
Oxford : 376 pages (2001).

Les cellules thécales sous l'action de la LH accroissent leur nombre de récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDL) pour favoriser l'entrée de cholestérol à l'intérieur des cellules. L'activité du système P450_{scc} (« side chain cleavage ») des mitochondries et celle du réticulum endoplasmique lisse est stimulée par la LH afin de convertir le cholestérol en androgènes. Les androgènes produits diffusent ensuite vers les cellules de la granulosa, où la FSH active l'aromatase, l'enzyme qui fait la conversion des androgènes en estrogènes. Ainsi, il y a production d'estrogènes (Heffner 2003).

1.2.3 Les estrogènes et leurs récepteurs

1.2.3.1 Généralités

La majorité des effets des estrogènes est médiée par leur récepteur spécifique, le récepteur à l'estrogène (ER), dont deux isoformes ont été identifiées, l'isoforme α (ER α) et l'isoforme β (ER β) (Gustafsson 1999). Le ER fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (Tsai et O'Malley 1994) et ses deux isoformes sont encodés par deux gènes différents (Enmark et al. 1997; Gosden et al. 1986). L'isoforme α du ER a été cloné pour la première fois en 1986 (Green et al. 1986; Greene et al. 1986; Walter et al. 1985). La protéine qu'il encode possède 595 acides aminés et un poids moléculaire de 66,2 kDa (Greene et al. 1986). Il est principalement exprimé dans les cellules du cerveau, du système cardiovasculaire, des seins, du foie, des os, du tractus urogénital et de l'utérus (Gustafsson 1999; Pearce et Jordan 2004). Dix ans après la découverte du premier isoforme du récepteur à l'estrogène, en 1996, l'isoforme β de ce récepteur a été découvert (Enmark et al. 1997; Mosselman et al. 1996). Le gène du ER β encode une protéine de 530 acides aminés avec un poids moléculaire de 59,2 kDa (Ogawa et al. 1998). Le ER β est principalement exprimé dans les cellules du cerveau, du système cardiovasculaire, des seins, des os, des tractus gastro-intestinal et urogénital, et de la prostate (Gustafsson 1999; Pearce et Jordan 2004). Ces deux isoformes peuvent donc être co-exprimés dans certains types cellulaires. Notons qu'au niveau de l'utérus, l'expression de l'isoforme ER α domine sur l'isoforme ER β (Gustafsson 1999; Pearce et Jordan 2004).

1.2.3.2 La structure du récepteur à l'estrogène

Comme les autres récepteurs de leur superfamille, la structure des isoformes du ER est subdivisée en six domaines : A, B, C, D, E et F (Shibata et al. 1997) (Fig.1.3). La région N-terminale du récepteur est subdivisée en régions A/B et C alors que la région C-terminale se subdivise en régions D, E et F (Shibata et al. 1997). La région A/B contient un domaine fonctionnel : le domaine de transactivation indépendant de

l'hormone (AF-1) (Kraus et al. 1995; Kumar et al. 1987). La région C contient le domaine de fixation à l'ADN (DBD) et de dimérisation du récepteur (Beato 1989; Evans 1988; Freedman 1992).

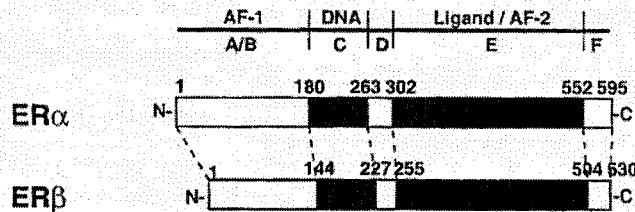


FIGURE 1.3 : Structure des deux isoformes du ER tiré de Katzenellenbogen, B.S. et al. "Molecular mechanisms of estrogen action : selective ligands and receptor pharmacology", J Steroid Biochem & Molecular Biol 74 : 279-285 (2000).

La région D aussi appelée région charnière contient un signal de localisation nucléaire (Kumar et al. 1986; Ylikomi et al. 1992). La région E contient plusieurs fonctions, dont les domaines de fixation au ligand (LBD), d'association aux protéines de choc thermique, de dimérisation, de localisation nucléaire et de transactivation dépendant de l'hormone (AF-2) (Evans 1988; Kumar et al. 1986; Kumar et al. 1987; Tsai et O'Malley 1994). La région F semble posséder des fonctions modulatrices minimales (Kumar et al. 1987). Les deux isoformes du ER possèdent des homologies de structure. Le domaine le plus homologue entre le ERα et le ERβ est le DBD avec 96% d'homologie alors que 53% d'homologie existe entre les deux LBD et 30% seulement pour les autres domaines (Ogawa et al. 1998).

1.2.3.3 La fonction du récepteur à l'estrogène

La fonction du récepteur à l'estrogène est de médier les effets des estrogènes lorsqu'une molécule se fixe au LBD. Le ER reconnaît aussi plusieurs ligands autres que les estrogènes, par exemple des molécules agonistes et antagonistes des effets des estrogènes (Kuiper et al. 1997; Shiao et al. 1998). Le ERα et le ERβ présentent des affinités similaires pour certains ligands comme c'est le cas avec le 17β-oestradiol (Kuiper et al. 1997). Ainsi, l'activité du récepteur dépend du ligand présent dans son domaine respectif. Il existe deux voies possibles par lesquelles les effets des estrogènes

peuvent être médiés : une voie génomique ou classique et une voie non-génomique ou rapide. La voie génomique, la plus connue, est une voie qui nécessite une interaction entre le ER et l'ADN pour médier les actions des estrogènes alors que la voie non-génomique n'est pas dépendante d'une interaction avec l'ADN pour induire des effets biologiques (Revelli et al. 1998; Rollerova et Urbancikova 2000).

1.2.3.4 La voie génomique d'action des estrogènes

1.2.3.4.1 Le mécanisme

Les estrogènes sont des molécules lipophiles qui possèdent la capacité de diffuser à travers la membrane plasmique des cellules (Fig.1.4). La liaison d'une molécule d'estrogène à son récepteur au niveau du noyau induit son activation. Sous cette activation, un changement de conformation du récepteur s'ensuit entraînant la dissociation d'une protéine de choc thermique qui séquestre le récepteur en absence de ligand. Le changement de conformation induit aussi l'exposition du DBD. Ce dernier site est constitué de deux « motifs à doigts de zinc », structure dans laquelle certains acides aminés forment deux boucles peptidiques (liens de coordination avec le zinc), nécessaires pour une interaction avec l'ADN (Tsai et O'Malley 1994). Une fois cette région libérée, elle pourra se lier avec les éléments de réponse aux estrogènes (ERE) devant la région promotrice d'un gène répondant aux estrogènes. Pour ce faire, il devra y avoir homo- ou hétéro- dimérisation entre les deux isoformes du ER et cette forme dimérique va reconnaître et se lier à la séquence palindromique des ERE (Cowley et al. 1997; Klock et al. 1987; Mosselman et al. 1996). La liaison du ER aux ERE module la transcription de certains gènes et la traduction du produit de ces gènes (Rollerova et Urbancikova 2000). Pour ce faire, l'ARN polymérase pourra fixer la région promotrice d'un gène pour en effectuer la transcription et donc la synthèse d'un ARNm (ARNm), par exemple, le gène Myc ou bien cycline D1 (Butt et al. 2005). Suite à sa maturation, l'ARNm sera traduit en protéines et donc induira une réponse initiale aux estrogènes (Brook et Marshall 1998). Dans notre exemple, les estrogènes induisent la production des protéines c-myc ou cycline D1. Ces deux dernières protéines peuvent

agir sur une même cible, soit la cycline E-cdk2 pour engendrer son activation. L'activation de la cycline E-cdk2 pourra engendrer ensuite d'autres réponses qui vont provoquer la formation d'autres ARNm et donc amplifier les effets des estrogènes puisque c-myc, cycline D1 et cycline E-cdk2 sont toutes des protéines importantes pour le passage au point de restriction dans le cycle cellulaire (Butt et al. 2005). Ainsi, lorsqu'elles sont toutes activées par les estrogènes, il y aura passage au point de restriction et progression dans le cycle cellulaire.

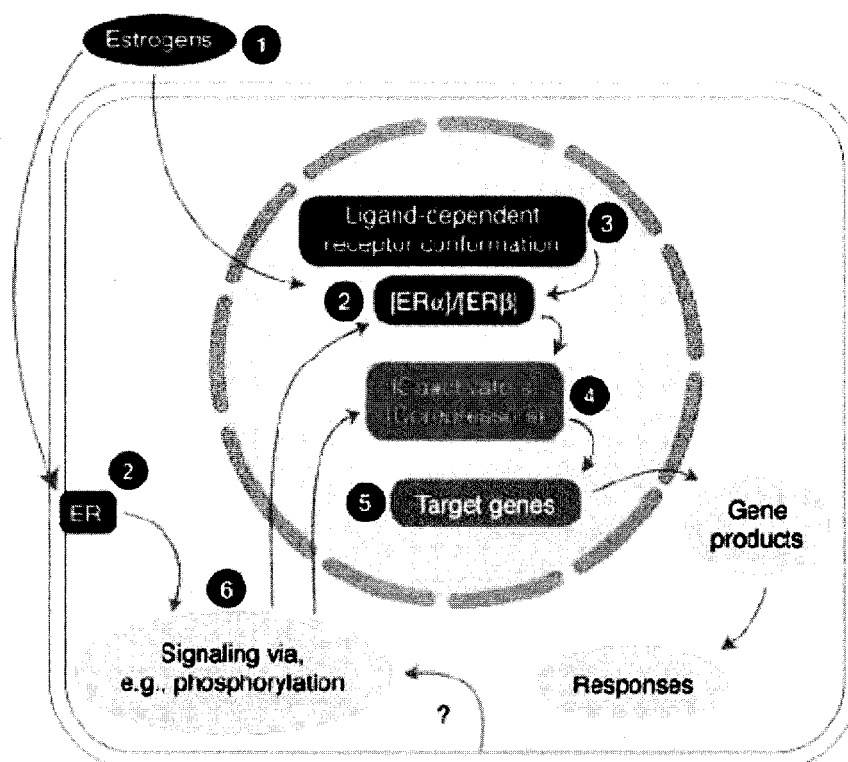


FIGURE 1.4 : Voie génomique et non-génomique d'action des estrogènes tiré de Turgeon, J.L. et al. "Hormone therapy : physiological complexity belies therapeutic simplicity", *Science* 304 : 1269-1273 (2004).

1.2.3.4.2 Les co-régulateurs

L'initiation de la transcription requiert l'interaction de plusieurs protéines au promoteur d'un gène cible. L'action du récepteur aux estrogènes implique non seulement le récepteur et son ligand, mais aussi des protéines appelées co-régulateurs (Katzenellenbogen et al. 2000). Les co-régulateurs sont en fait des protéines qui

peuvent exercer une action sur l'induction de la transcription. Les co-régulateurs peuvent être de deux types soient, des co-activateurs ou des co-répresseurs. Les co-activateurs favorisent la transcription alors que les co-répresseurs inhibent celle-ci (McKenna et al. 1999; Pearce et Jordan 2004). Les co-régulateurs existent en de multiples complexes et possèdent plusieurs activités enzymatiques. Par exemple, pour interagir avec le ER, ils peuvent modifier des composants de la chromatine comme des histones ou bien agir sur des composants de la machinerie basale de transcription ou encore sur les deux (Nilsson et al. 2001). Le ER peut s'associer avec des co-régulateurs différents dépendant de leur affinité de fixation et de leur abondance relative (Nilsson et al. 2001) pour médier la réponse transcriptionnelle aux hormones des cellules cibles (McKenna et al. 1999). L'activité du ER n'est donc pas seulement déterminée par le ligand mais aussi par le recrutement et la dissociation des différents co-régulateurs (Chen 2000).

1.2.3.4.3 Le répresseur de l'activité du récepteur à l'estrogène

Plusieurs co-régulateurs exerçant une action sur le récepteur à l'estrogène sont à ce jour répertoriés, mais la plupart ont aussi une action sur les autres récepteurs des hormones stéroïdiennes incluant le récepteur à la progestérone. Un seul co-répresseur spécifique du récepteur à l'estrogène n'est connu à ce jour. Il s'agit du répresseur de l'activité du récepteur à l'estrogène (REA). Celui-ci n'agit sur aucun autre récepteur stéroïdien ou non-stéroïdien (Montano et al. 1999). L'action du REA s'effectue autant sur le ER α que sur le ER β . De préférence, il interagit avec le ER lorsqu'il est lié à un ligand contrairement aux autres co-répresseurs qui interagissent avec un récepteur non lié. De plus, le REA peut interagir avec le ER fixé avec un ligand de nature tant oestrogénique qu'anti-oestrogénique (Katzenellenbogen et al. 2000). Il n'interfère pas dans l'interaction entre le ER et les ERE. Les niveaux d'expression du REA serait déterminant dans le potentiel d'inhibition de l'activité des estrogènes par les anti-estrogènes. Quand les niveaux de REA sont élevés, le potentiel de suppression de l'activité du ER par les anti-estrogènes est augmenté et la réponse aux estrogènes est

réduite (Katzenellenbogen et al. 2000). Découvert seulement en 1999 (Montano et al. 1999), ce co-répresseur est encore peu défini dans la littérature.

1.2.3.5 La voie non-génomique d'action des estrogènes

1.2.3.5.1 Le mécanisme

Tel que décrit précédemment, les estrogènes exercent plusieurs effets par le biais de leurs récepteurs. Par contre, certains effets des estrogènes sont trop rapides pour permettre la synthèse d'ARNm et de protéines (Fig.1.4). Dans certains types cellulaires, les estrogènes sont capables d'induire l'activation de voies de signalisation cellulaire de façon indépendante du ER dont entre autre, la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)/Akt (Guzeloglu et al. 2004; Marino et al. 2003; Tsai et al. 2001), une voie importante pour la survie cellulaire. Ces derniers effets découlent d'une action non-génomique des estrogènes. Malheureusement, le mécanisme par lequel les actions non-génomiques des estrogènes ont lieu demeure toujours à définir. Pour l'instant, certaines évidences portent à croire que les estrogènes peuvent exercer leurs actions non-génomiques et rapides à partir de récepteurs à l'estrogène membranaires (Norman et al. 2004). Cependant, les recherches sur l'identification de ces derniers ne sont pas claires et subissent présentement une controverse (Nadal et al. 2001; Norman et al. 2004). Deux propositions de récepteurs à l'estrogène membranaires aux actions non-génomiques sont maintenant étudiées : la première implique le ER et soutient que celui-ci soit associé à une structure de la membrane cellulaire comme les protéines G, les cavéolines ou les récepteurs de tyrosine kinases alors que la deuxième proposition concerne une protéine autre que le ER qui serait associée à la membrane cellulaire et qui aurait la capacité de fixer les estrogènes (Hewitt et al. 2005; Nadal et al. 2001).

1.2.3.5.2 Le récepteur à l'estrogène membranaire

Certaines études affirment qu'il existe des isoformes α du ER au niveau membranaire dans certains types cellulaires (Pappas et al. 1995; Pietras et Szego 1977).

Une autre étude présente une transfection de cellules CHO (« Chinese hamster ovary ») qui n'expriment pas naturellement le ER avec de l'ADN complémentaire (ADNc) du ER α et du ER β . Les auteurs de cette étude ont démontré que les deux isoformes étaient exprimés au niveau de la membrane en plus du noyau, mais avec une densité membranaire moindre que celle nucléaire (Razandi et al. 1999). Ils ont pu en conclure que le ER membranaire est originaire du même transcrit que le ER nucléaire. Le mécanisme par lequel le même transcrit peut générer à la fois une protéine membranaire et une autre nucléaire fait objet d'une controverse (Nadal et al. 2001). Pour s'insérer dans la membrane, la protéine doit être munie d'un domaine transmembranaire et ce domaine est inexistant dans les protéines originales du ER α et ER β . La possibilité d'une insertion additionnelle n'est pas envisageable car les protéines membranaires et nucléaires du ER ont exactement le même poids moléculaire (Razandi et al. 1999). Pour l'instant, le mécanisme par lequel le ER se retrouve au niveau de la membrane est inconnu et nécessite de plus amples investigations.

1.2.3.5.3 Le GPR30

Certaines actions non-génomiques des estrogènes ont déjà été identifiées dans des cellules qui ne possèdent pas le ER (Losel et Wehling 2003) ce qui porte à croire qu'il existe un autre type de récepteur à l'estrogène qui peut agir dans la voie non-génomique des estrogènes. Certains chercheurs spéculent que les actions non-génomiques des estrogènes utiliseraient des récepteurs de la famille des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) (Filardo et al. 2000). Les récepteurs de cette famille sont transmembranaires et activent, pour transmettre le signal reçu aux effecteurs cellulaires, un ou plusieurs membres des protéines transductrices de signaux par fixation du nucléotide guanine (protéines G) (Bourne et al. 1990; Sprang 1997). Ces dernières protéines vont ensuite influencer les niveaux de seconds messagers qui vont eux-mêmes générer une panoplie de processus cellulaires incluant la prolifération et la différenciation cellulaires (Dhanasekaran et al. 1995; van Biesen et al. 1996). En 1997, un nouveau récepteur de la famille des GPCR a été découvert et nommé GPR30 (Carmeci et al. 1997). Le GPR30 est situé au niveau de la membrane cellulaire. Structuellement, le GPR30 n'est

pas relié au ER nucléaire, mais il possède des caractéristiques d'un ER comme la capacité à fixer l'estrogène. Ce récepteur est le candidat idéal pour expliquer le fait que les estrogènes puissent médier des actions rapides à la surface cellulaire et aussi agir dans des cellules cibles qui ne possèdent pas le ER α et le ER β . Le GPR30 a une forte affinité pour le 17 β -oestradiol, mais aussi pour certains anti-estrogènes comme le tamoxifène et le ICI 182 780 (Thomas et al. 2005). Malheureusement, sa découverte étant récente, très peu d'informations sont disponibles à son sujet.

1.3 L'utérus

1.3.1 La physiologie de l'utérus

L'utérus est un organe féminin qui possède la grosseur et la forme d'une poire renversée et qui est situé entre la vessie et le rectum (Fig.1.5) (Tortora et Grabowski 2001). Cet organe est le siège de la menstruation, de l'implantation d'un ovule fécondé, du développement du fœtus pendant la gestation et de l'accouchement. L'utérus se divise en trois parties anatomiques : dans sa partie supérieure, le fundus de l'utérus, dans sa partie centrale, le corps de l'utérus et dans sa partie inférieure, le col de l'utérus. L'intérieur de l'utérus se nomme cavité utérine. Au niveau histologique, l'utérus est composé de trois couches tissulaires : une couche externe, le périmétrium, une couche moyenne, le myomètre et une couche interne, l'endomètre. Le périmétrium est une séreuse qui fait partie intégrante du péritoine viscéral et qui est composé d'un épithélium pavimenteux simple et de tissu conjonctif aréolaire. Le myomètre est constitué de trois feuillets de fibres musculaires lisses. L'endomètre est très vascularisé et est composé d'une couche interne d'épithélium prismatique simple recouvrant la lumière, d'un stroma sous-jacent épais fait de tissu conjonctif aréolaire et de glandes utérines qui s'étendent de la lumière jusqu'au myomètre. L'endomètre de l'utérus est constitué de deux couches : une couche fonctionnelle et une couche basale (Fig.1.6). La couche fonctionnelle tapisse la cavité utérine et elle est éliminée lors des menstruations alors que la couche basale est permanente et régénère la couche fonctionnelle à la suite des menstruations (Tortora et Grabowski 2001).

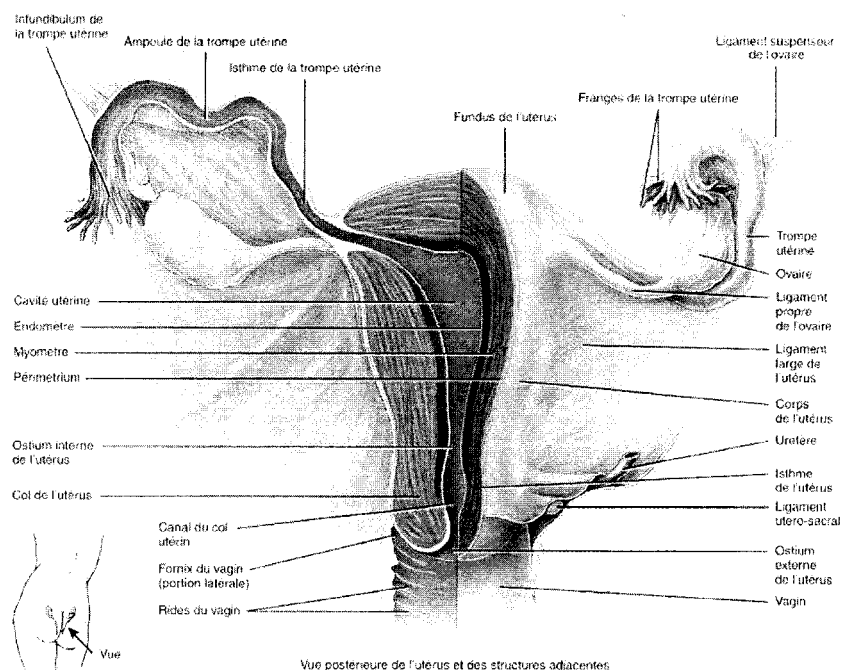


FIGURE 1.5 : Anatomie de l'utérus tiré de Tortora,G.J. et Grabowski,S.R. "Principes d'anatomie et de physiologie", traduction de la 9^e édition anglaise, Éditions du renouveau pédagogique, Saint-Laurent : 1121 pages (2001).

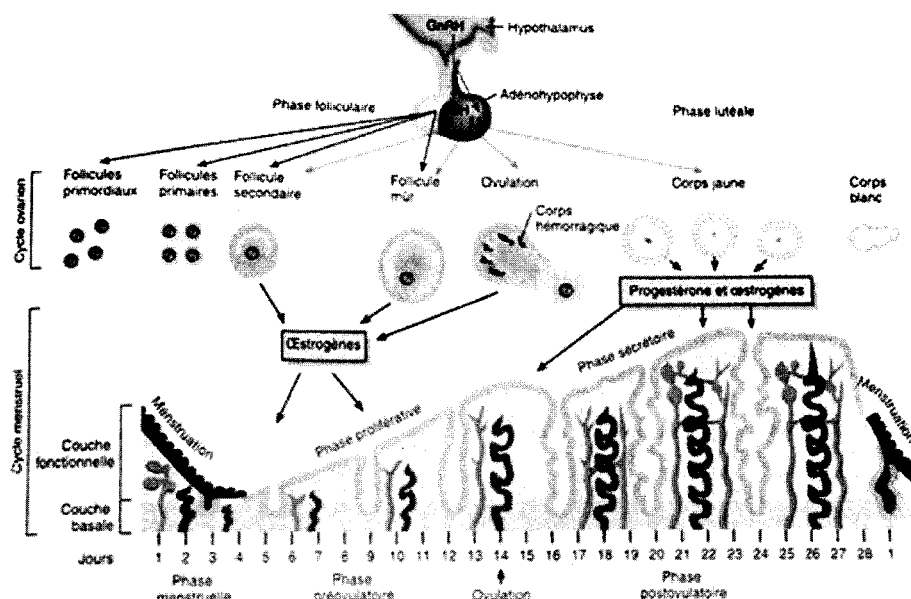


FIGURE 1.6 : Cycle de la reproduction chez la femme tiré de Tortora,G.J. et Grabowski,S.R. "Principes d'anatomie et de physiologie", traduction de la 9^e édition anglaise, Éditions du renouveau pédagogique, Saint-Laurent : 1121 pages (2001).

1.3.2 Le cycle menstruel

L'endomètre subit des modifications tant structurales que fonctionnelles au niveau glandulaire en réponse aux hormones durant le cycle menstruel (Tortora et Grabowski 2001). Le cycle menstruel se divise en quatre phases : menstruelle, pré-ovulatoire, ovulatoire et post-ovulatoire (Fig.1.6). La phase menstruelle est d'abord caractérisée par une diminution de la concentration des hormones ovariennes (estrogènes et progestérone) et plus particulièrement de la progestérone. Une constriction des artérioles spiralées s'ensuit stimulée par une libération de prostaglandines ce qui entraîne la mort des cellules irriguées par ces artérioles. Ainsi, la couche fonctionnelle de l'endomètre se desquame et est évacuée sous forme d'écoulement sanguin pour ne laisser place qu'à la couche basale. La phase pré-ovulatoire ou phase proliférative, est basée principalement sur la reconstruction de la couche fonctionnelle de l'endomètre. Les cellules de la couche basale entrent dans le cycle cellulaire pour régénérer la couche fonctionnelle en réponse aux estrogènes libérés par les follicules ovariens en cours de maturation. Au cours de l'épaississement de la couche fonctionnelle, des glandes se forment et des artérioles s'émancipent entre celles-ci. La phase ovulatoire est en fait la rupture du follicule ovarien devenu mûr et la libération de l'ovule qu'il contient. Cette phase n'induit pas directement d'effets au niveau de l'utérus. La dernière phase, la phase post-ovulatoire ou sécrétoire, constitue la suite de la prolifération de la couche fonctionnelle. En réponse à la progestérone et aux estrogènes libérés par le corps jaune, les glandes utérines croissent et s'enroulent, la vascularisation et l'épaississement de l'endomètre se poursuit et la quantité de liquide contenue dans les tissus augmente. En l'absence d'implantation d'un blastocyste, une dégénérescence du corps jaune s'ensuit diminuant la concentration de progestérone et engendrant donc, le début de la phase menstruelle (Tortora et Grabowski 2001).

1.3.3 La carcinogénèse

1.3.3.1 La physiologie d'un tissu sain

Un tissu sain est constitué de cellules à l'intérieur desquelles il se produit continuellement un équilibre entre l'ensemble des facteurs qui favorisent la survie et la mort cellulaire. Ces facteurs sont en fait des gènes codant pour des protéines qui favorisent la prolifération cellulaire appelé proto-oncogènes et d'autres qui inhibent la prolifération cellulaire portant le nom de gènes suppresseurs de tumeur. Une mutation à l'intérieur du gène d'un proto-oncogène active celui-ci constitutivement, c'est-à-dire de façon dominante dans la cellule, et ce gène sera alors devenu un oncogène. Au contraire, une mutation sur les deux allèles à l'intérieur d'un gène suppresseur de tumeur va induire son inactivation (Griffiths et al. 2001). Ainsi, l'oncogène va constamment favoriser une prolifération cellulaire alors que le gène suppresseur de tumeur muté sur les deux allèles va perdre sa capacité à freiner cette prolifération cellulaire non nécessaire. Bref, que les mutations activent un proto-oncogène ou inactivent un gène suppresseur de tumeur, dans les deux cas, elles vont favoriser la prolifération cellulaire. Généralement, l'apparition d'une mutation vient déplacer l'équilibre qui régit le fonctionnement de la cellule et la cellule y répond rapidement en enclenchant sa propre destruction par un processus de mort cellulaire appelé apoptose et ce, afin d'éviter d'engendrer d'autres cellules problématiques. Par contre, dans certains cas, la cellule devient tellement déséquilibrée, à la suite d'une série de mutations par exemple, qu'il lui est impossible de se détruire, on dira alors que c'est une cellule transformée (Griffiths et al. 2001; Heffner 2003).

1.3.3.2 Le développement d'un cancer

Une cellule transformée priorise sa survie au dépend de sa mort cellulaire, ce qui signifie qu'elle pourra se multiplier malgré les déficiences qu'elle possède et donc engendrer d'autres cellules transformées (Griffiths et al. 2001). Le développement d'un cancer débute ainsi par une seule cellule qui s'est transformée à l'intérieur d'un tissu

sain (Fig.1.7). La cellule transformée se multiplie et forme un nodule de cellules tumorales à l'intérieur du tissu sain que l'on nomme tumeur bénigne. Lorsque la tumeur atteint la lame basale aux abords du tissu, la tumeur est devenue maligne. Il s'agira alors d'un cancer. Puis, à ce stade, certaines cellules de la tumeur pourront rejoindre les vaisseaux sanguins et engendrer d'autres tumeurs à l'intérieur de l'organisme que l'on appellera métastases (Lodish et Darnell 1997).

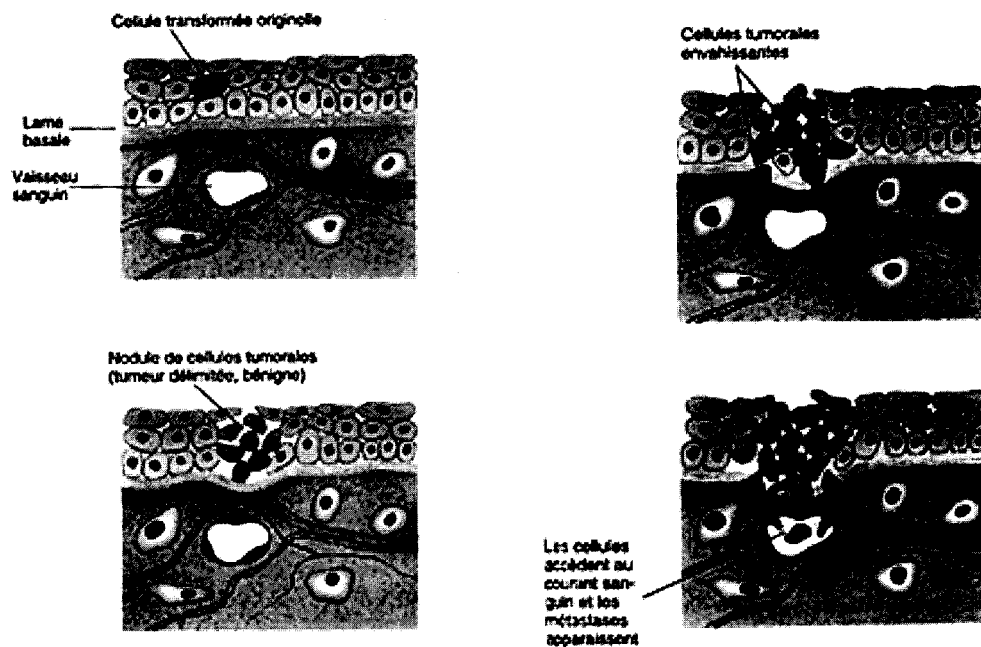


FIGURE 1.7 : Développement d'un cancer tiré de Lodish,H.F. et Darnell,J.E. "Biologie moléculaire de la cellule", traduction de la 3^e édition anglaise, De Boeck Université, Belgique : 1344 pages (1997).

1.3.4 Le cancer de l'utérus

1.3.4.1 Généralités

Le cancer de l'utérus, aussi appelé cancer de l'endomètre, est au premier rang en incidence parmi les cancers gynécologiques et au quatrième parmi tous les types de cancer au Canada et à l'échelle mondiale (Parkin et al. 2005; Société canadienne du cancer 2004). Il existe deux types de cancer de l'endomètre : le type 1 appelé endométrioïde et le type 2 dit non-endométrioïde. Approximativement 70 à 80% des

cancers de l'endomètre sont du type 1 (Fig.1.8). Ce premier type est associé avec une exposition aux estrogènes en absence de progestérone alors que le second type n'est pas relié à des facteurs hormonaux (Bokhman 1983; Deligdisch et Holinka 1987; Sherman et al. 1995). Notre étude s'intéresse au cancer de l'utérus en lien avec des facteurs hormonaux ainsi, notre intérêt dans ce texte sera seulement accordé au cancer de l'utérus de type 1. Conséquemment, les termes suivants : « cancer de l'utérus » et « cancer de l'endomètre » utilisés dans la suite de ce mémoire seront équivalents au type endométrioïde.

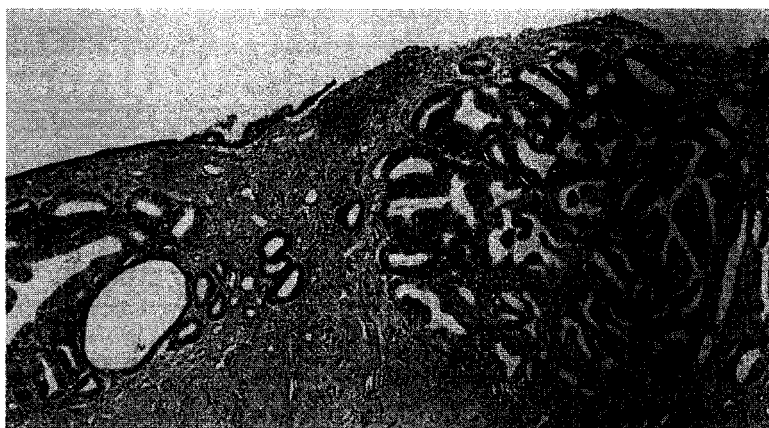


FIGURE 1.8 : Coupe histologique d'un carcinome endométrioïde tiré de Fuller,A.F. et al. "Uterine cancer", 1^{ère} édition, BC Decker Inc, Hamilton : 230 pages (2004).

1.3.4.2 L'histologie

Le cancer de l'endomètre au niveau histologique est caractérisé par la disparition du stroma entre les glandes qui, elles, sont devenues anormales et ont infiltré la lumière utérine. Les cellules présentent une distribution désordonnée de la chromatine nucléaire et un élargissement du noyau. On peut aussi y observer un degré variable de mitoses, de nécroses et d'hémorragies (Kufe et al. 2003).

1.3.4.3 L'étiologie et les facteurs de risque

L'étiologie principale du cancer de l'utérus est explicable par une exposition cumulative de l'endomètre aux estrogènes en absence de progestérone (Henderson et al.

1982; Henderson et al. 1988). Les estrogènes exercent une pression sur les cellules de l'endomètre pour favoriser leur prolifération cellulaire. Cette augmentation de la prolifération cellulaire peut mener à l'apparition d'un phénotype malin conséquemment à certaines générations de cellules à phénotype différent par des erreurs de copies d'ADN, de réarrangement chromosomal, etc. (Henderson et al. 1988) (Fig.1.9).

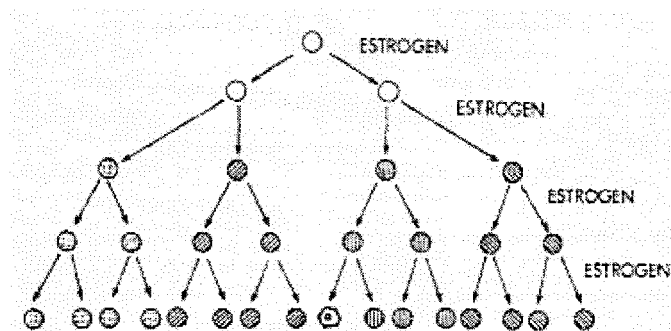


FIGURE 1.9 : Apparition d'un phénotype malin suite à des expositions cumulées aux estrogènes tiré de Henderson,B.E. et al. "Estrogens as a cause of human cancer : the Richard and Hinda Rosenthal foundation award lecture", Cancer Res 48 : 246-253 (1988).

Les facteurs de risque s'expliquent largement par des conditions menant à un excès d'estrogènes relativement à la quantité de progestérone. L'âge dans la cinquantaine et plus, l'obésité, la nulliparité (absence de grossesse), la ménopause tardive, la prise d'estrogènes en absence de progestatif et l'exposition à long terme au tamoxifène sont les principaux facteurs de risque (Société canadienne du cancer 2004). Chez les femmes obèses, le tissu adipeux devient une source d'estrogènes puisque celui-ci contient de l'aromatase, l'enzyme qui transforme les androgènes en estrogènes (voir section 1.1.2). Une synthèse d'estrogènes à partir des androgènes surrénaliens s'effectue donc dans ces tissus augmentant, conséquemment, la biodisponibilité des estrogènes (Kilgore et al. 1995). La nulliparité expose les femmes à une quantité d'estrogènes plus importante durant leur vie que les femmes qui ont eu des enfants puisque, durant la grossesse, un changement dans la balance des hormones ovariennes favorise la progestérone plutôt que les estrogènes (American cancer society 2005). La ménopause tardive se traduit par une exposition aux estrogènes à plus long terme chez les femmes dans cette situation. La prise d'estrogènes en absence de progestatif vient une fois de plus augmenter les effets des estrogènes chez les femmes ayant fait utilisation de cette médication. Le

tamoxifène est un médicament qui possède une activité agoniste des estrogènes au niveau de l'endomètre, c'est pourquoi il augmente le risque de développer un cancer endométrial (Fisher et al. 1994; Fornander et al. 1989). Contrairement aux estrogènes, la progestérone joue un rôle protecteur au niveau de l'utérus en diminuant les niveaux d'expression du ER au niveau des cellules épithéliales de l'endomètre et en favorisant le métabolisme de l'oestradiol par l'activation de la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase à faire la conversion de l'oestradiol en oestrone, donc en un estrogène plus faible (Greenspan et Gardner 2004).

1.3.4.4 Les manifestations et le diagnostic

De manière générale, l'origine du cancer de l'endomètre provient de ses tissus glandulaires correspondant à un adénocarcinome. Le cancer de l'utérus ne présente pas de symptômes vraiment révélateurs du cancer; ils sont principalement des saignements irréguliers ou post-ménopausaux, pertes et douleurs ou inconfort dans la région pelvienne. Le diagnostic se pose suite à une dilatation fractionnée et un curettage de l'utérus avec biopsies de la cavité de l'endomètre et du canal endocervical. L'examen peut parfois nécessiter une hystéroscopie ou des techniques d'imagerie comme l'imagerie par résonance magnétique (MRI) ou l'ultrasonographie pour confirmer le diagnostic (Kufe et al. 2003).

1.3.4.5 La stadification

Suite au diagnostic, il faut déterminer le stade de la tumeur. Celui-ci dépend de la taille et du degré de propagation de la tumeur (Société canadienne du cancer 2004). C'est la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO) qui a établi les modalités de la détermination du stade d'un cancer endométrial. Pour déterminer le stade de la tumeur, les patientes atteintes doivent subir une hystérectomie totale combinée avec une salpingo-ovariectomie bilatérale (chirurgie retirant l'utérus ainsi que les trompes utérines et les ovaires), des lavements pour examens cytologiques et une biopsie des tissus suspects environnants (Kufe et al. 2003). Lors de l'opération, certains

autres tissus peuvent être échantillonnés en fonction de l'invasion de la tumeur. Les stades du cancer de l'utérus sont définis comme suit : le stade 0 indique un cas d'hyperplasie atypique de l'endomètre avec histologie suspectée d'être maligne, le stade I peut être subdivisé en IA ou IB et représente un carcinome restreint au corps de l'utérus de longueur inférieure (IA) ou supérieure (IB) à 8 cm et, finalement, le stade II signifie que le carcinome s'est répandu au corps et au col de l'utérus sans s'être propagé en dehors de l'utérus. Le système FIGO est un excellent indicateur du taux de survie sans récurrence (Kufe et al. 2003). Selon un rapport récent, le taux de survie sans récurrence est de 90% pour le stade I, de 83% pour le stade II et de 43% pour le stade III (Maneschi et al. 1992).

1.3.4.6 Les traitements

Les traitements sont principalement la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie. La chirurgie privilégiée lors d'un diagnostic de cancer de l'utérus est une hystérectomie combinée avec une salpingo-ovariectomie bilatérale. Cette chirurgie est en fait celle déjà effectuée au moment de la détermination du stade de la tumeur. La seconde thérapie la plus efficace est la radiothérapie. Généralement, cette dernière est combinée à la chirurgie et s'avère être le traitement de choix pour la majorité des patientes. Dans les cas de cancer de l'utérus récurrent, la chimiothérapie et l'hormonothérapie sont des traitements de choix. Le traitement chimiothérapeutique privilégie les médicaments doxorubicine, cisplatine, paclitaxel et cyclophosphamide seuls ou en combinaison pour augmenter l'efficacité du traitement. L'hormonothérapie consiste à la prise de progestatifs afin de contrer les effets des estrogènes principalement le 17 α -hydroxyprogestérone caproate, la médroxyprogestérone et le mégestrol acétate (Kufe et al. 2003).

1.4 Les anti-estrogènes

1.4.1 Généralités

Les anti-estrogènes sont des composés qui compétitionnent avec les estrogènes pour fixer le ER, mais qui sont incapables de l'activer (Katzenellenbogen et al. 1997; Webster et al. 1988). Ils peuvent être classés en deux groupes : les anti-estrogènes de type 1 et de type 2 (Katzenellenbogen 1996; MacGregor et Jordan 1998). Les anti-estrogènes de type 1 sont des composés qui peuvent avoir des actions oestrogéniques ou anti-oestrogéniques (antagonistes partiels de l'estrogène) dépendant du tissu cible. Les anti-estrogènes de type 2 sont de purs anti-estrogènes, c'est-à-dire qu'ils n'ont aucune action oestrogénique. Parmi les anti-estrogènes de type 1, il y a le tamoxifène, le 4-hydroxytamoxifène et le raloxifène qui sont particulièrement connus et parmi le type 2, il y a le ICI 164 384 et le ICI 182 780 (MacGregor et Jordan 1998) (Fig.1.10).

1.4.2 Les anti-estrogènes de type 1

Les anti-estrogènes de type 1 sont aussi appelés communément les modulateurs sélectifs du récepteur à l'estrogène (SERMs) (Haskell 2003; Pike et al. 2001). Ils sont généralement de nature non-stéroïdienne (Howell et al. 1996). Le tamoxifène (Nolvadex[®] ou ICI 46 474 ou *trans*-1-(4- β -diméthylaminoéthoxyphényl)-1,2-diphényl but-1-ène (Jordan et al. 1977)) est le médicament le plus répandu donné en prévention et en traitement contre le cancer du sein et ce, tant chez les femmes que chez les hommes (Fisher et al. 1998; MacGregor et Jordan 1998; Taylor et Taguchi 2005; Ugwumadu et al. 1998). Le tamoxifène à l'intérieur du corps humain est métabolisé au niveau des cellules du foie en 4-hydroxytamoxifène qui exerce les mêmes propriétés agonistes et antagonistes que le tamoxifène tout en possédant plus d'affinité pour le ER (Jordan et al. 1977). Le tamoxifène utilisé en prévention diminue de 49% le risque de développer un cancer du sein (Fisher et al. 1998). De plus, il augmente le taux de survie des personnes atteintes de cancer du sein (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1992) et il diminue le risque de cancer du sein controlatéral de 54% lorsqu'il est

administré sur une période de plus de deux ans (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998).

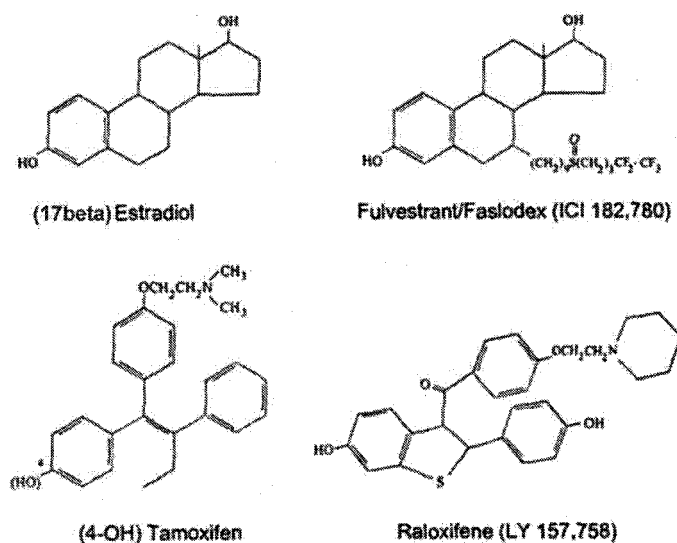


FIGURE 1.10 : Structure du 17 β -oestradiol et de trois anti-estrogènes majeurs adapté de Platet,N. et al. "Estrogens and their receptors in breast cancer progression : a dual role in cancer proliferation and invasion", Critical Rev Oncol/Hematol 51 :55-67 (2004).

Le tamoxifène exerce une activité antagoniste des estrogènes au niveau du sein alors que son activité est agoniste au niveau de l'utérus et des os (Katzenellenbogen et al. 1997). L'usage à long terme du tamoxifène augmente le risque de développer un cancer de l'endomètre (Fisher et al. 1994; Fornander et al. 1989). Le risque est évalué à trois ou quatre sur 1000 par année, et ce uniquement chez les femmes post-ménopausées (Kufe et al. 2003). Certains patients ne répondent pas bien au traitement avec le tamoxifène, c'est-à-dire que seulement 50-60% des patients avec un cancer exprimant le ER α y répondent efficacement (Santen et al. 1990) et certains patients développent une résistance à celui-ci (Howell et Robertson 1995; Wolf et Jordan 1993). D'où est venu l'importance de développer de nouveaux composés anti-oestrogéniques qui pourraient être aussi efficace que le tamoxifène sans ses inconvénients. Le raloxifène (Evista® ou kéoxifène (MacGregor et Jordan 1998) ou LY 156,758 ou LY 139,481 ou [6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-benzo[b]thien-3-yl][4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]phenyl]methanone (Jones et al. 1984) est un anti-estrogène partiel comme le tamoxifène qui possède une activité anti-oestrogénique au niveau du sein et de l'utérus et une activité oestrogénique

au niveau des os (Cummings et al. 1999; Delmas et al. 1997). D'abord conçu pour le traitement du cancer du sein (Brown 2002), il est maintenant principalement prescrit pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose chez les femmes (Delmas et al. 1997; Goldstein 2001) comme son efficacité n'était pas suffisante au niveau du cancer du sein en comparaison avec le traitement au tamoxifène (Brown 2002). Le raloxifène, en comparaison avec le tamoxifène, ne présente pas d'effets agonistes des estrogènes au niveau de l'utérus (Cummings et al. 1999; Delmas et al. 1997). Ces deux composés ont une structure différente, le tamoxifène est structuré en triphényléthylène alors que la structure du raloxifène est en benzothiophène (MacGregor et Jordan 1998). Comme les bénéfices du tamoxifène surpassent ses effets néfastes, celui-ci demeure, encore aujourd'hui, la thérapie endocrinienne à privilégiée face au cancer du sein (MacGregor et Jordan 1998). Une étude clinique de grande envergure échelonnée sur 5 ans a débutée en 1999, pour comparer l'efficacité de l'utilisation du tamoxifène et du raloxifène en prévention du cancer du sein chez des femmes ménopausées à haut risque pour ce cancer. Les résultats de cette étude nommée STAR (« study of tamoxifen and raloxifene ») devraient être publiés très prochainement (Dunn et Ford 2001).

1.4.3 Les anti-estrogènes de type 2

Le ICI 164 384 (*N*-butyl-*N*-methyl-11-(3,17 β -dihydroxyoestra-1,3,5-(10)-trien-7 α -yl)undecanamide) et le ICI 182 780 (Faslodex[®] ou fulvestrant ou 7 α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)nonyl]oestra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol) sont deux purs anti-estrogènes qui n'ont aucune propriété oestrogénique peu importe le tissu cible. Ces deux composés stéroïdiens sont, en fait, des dérivés du 17 β -oestradiol ayant une chaîne latérale en position 7 α (Wakeling et al. 1991; Wakeling et Bowler 1988). Le ICI 182 780 a démontré un meilleur potentiel que le ICI 164 384 pour le traitement du cancer du sein (Wakeling et al. 1991). Il a démontré son efficacité en seconde thérapie endocrinienne suite à un échec du tamoxifène (Howell et Robertson 1995). Il est maintenant prescrit pour les cancers du sein localement avancés ou métastatiques chez les femmes ménopausées (de Cremoux et al. 2004) ou dans les cas de développement d'une résistance au traitement avec le tamoxifène (Howell et Robertson 1995). Le ICI

182 780 bloque les effets des estrogènes en régulant de façon négative l'expression du ER α pour ainsi mener à sa disparition totale (DeFriend et al. 1994).

1.5 Les autres sources oestrogéniques

1.5.1 Généralités

Depuis des décennies, les effets prolifératifs des estrogènes sont étudiés en culture avec des cellules hormono-dépendantes et ce, principalement avec des cellules cancéreuses du sein. Pour étudier de façon plus précise les effets des estrogènes, des techniques ont été développées pour éliminer les estrogènes, les hormones stéroïdiennes et autres composés à activité oestrogénique des composantes utilisées pour la culture cellulaire.

1.5.2 Le sérum

En culture cellulaire, on utilise un milieu de culture qui contient des nutriments essentiels, mais aussi du sérum qui fournit des éléments clés pour la croissance. Le sérum que l'on utilise est d'origine animale et contient tous les éléments pour supporter la survie et la croissance des cellules. Il est utilisé pour remplacer tous les éléments nutritionnels et hormonaux présents dans l'environnement *in vivo*. Le sérum contient des hormones stéroïdiennes, des facteurs de croissance, des lipides, des protéines de transport, des co-facteurs enzymatiques et des facteurs d'attachement (Barnes et Sato 1980). Les hormones stéroïdiennes contenues dans le sérum peuvent influencer les résultats d'études sur les effets des estrogènes. La technique la plus répandue pour éliminer les hormones stéroïdiennes du sérum est sans contredit celle du traitement au charbon-dextran (Darbre et al. 1983; Leake et al. 1987). Brièvement, le charbon activé est capable de capter les stéroïdes libres grâce à sa structure formée de plusieurs micropores qui emprisonnent les petites molécules et donc, les hormones stéroïdiennes. Pour sa part, le dextran est un polymère de sucres qui va entourer les molécules de

charbon et empêcher les plus grosses particules de pénétrer à l'intérieur de celles-ci. Il n'influence en rien la capacité d'absorption du charbon (Boxen et Tevaarwerk 1982).

1.5.3 Le rouge de phénol

En 1986, l'équipe de Berthois et al. révolutionne les connaissances en matière de culture cellulaire en lien avec les estrogènes, en faisant la découverte que le rouge de phénol (« phenolsulfonphthalein ») (Fig.1.11), contenu dans le milieu de culture comme indicateur de pH, possède un effet oestrogénique sur le ER aux concentrations présentes dans les milieux de culture.

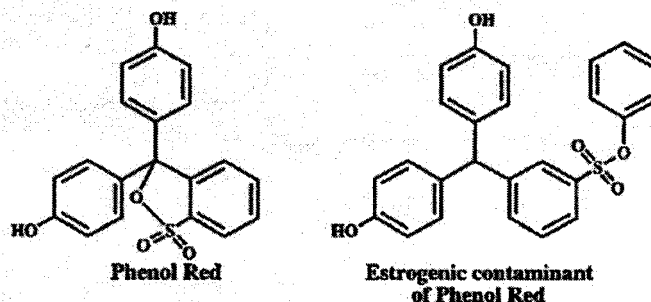


FIGURE 1.11 : Structure du rouge de phénol et de son contaminant tiré de MacGregor, J.I. et Jordan, V.C. "Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action", Pharmacological Rev 50, 2: 151-196 (1998).

Selon cette étude, le rouge de phénol se fixe au récepteur à l'estrogène et stimule la prolifération cellulaire et la synthèse de protéines spécifiques chez des cellules sensibles aux estrogènes. En plus, cette étude a démontré que le rouge de phénol était présent en quantité suffisante dans les milieux de culture pour masquer en partie d'autres effets oestrogéniques (Berthois et al. 1986). Ces auteurs ont aussi suggéré de considérer l'activité du rouge de phénol dans tous les cas d'études hormono-dépendantes. Deux ans après la publication de l'étude de Berthois et al. (1986), on démontrait que ce n'est pas la molécule de rouge de phénol comme telle qui possède des effets oestrogéniques, mais que ces effets sont plutôt attribuables à un contaminant présent dans sa préparation (Bindal et al. 1988; Bindal et Katzenellenbogen 1988). Ce contaminant aux propriétés

oestrogéniques est en fait un composé formé par la dimérisation de composants utilisés dans la synthèse du rouge de phénol (Bindal et Katzenellenbogen 1988).

1.6 But de l'étude

Le tamoxifène est un médicament très répandu pour le traitement du cancer du sein malgré qu'il soit un facteur de risque important pour le cancer de l'utérus. Considérant l'incidence du cancer du sein qui est au premier rang au Canada ainsi qu'à l'échelle mondiale (Parkin et al. 2005; Société canadienne du cancer 2004), l'administration du tamoxifène en prévention et en traitement de ce cancer contribue à maintenir une incidence élevée du cancer de l'utérus. Ainsi, l'étude des effets du 4-hydroxytamoxifène, le métabolite actif du tamoxifène, au niveau de lignées cancéreuses utérines permettrait de mieux comprendre son mécanisme d'action. Le raloxifène et le ICI 182 780 n'ayant aucun effet agoniste des estrogènes connu au niveau de l'utérus, l'étude de leurs effets en comparaison avec ceux du 4-hydroxytamoxifène augmenterait d'autant plus notre compréhension des effets de ce dernier composé au niveau de lignées cancéreuses utérines. Notre étude a donc pour but d'étudier les effets du 17β -oestradiol, du 4-hydroxytamoxifène, du raloxifène et du ICI 182 780 sur la prolifération cellulaire de six lignées cancéreuses de l'utérus (HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa et EN-1078D) sous deux types de conditions cellulaires : la présence d'estrogènes (présence de rouge de phénol et de sérum standard) et l'absence d'estrogènes (absence de rouge de phénol et présence de sérum traité au charbon-dextran). À plus long terme, la compréhension du mécanisme d'action du tamoxifène au niveau du cancer de l'utérus pourrait nous permettre de développer des stratégies pour contrer ses effets sur ce cancer, des thérapies plus ciblées selon le génotype des patientes et un anti-estrogène idéal.

Dans les sections suivantes, vous pourrez prendre connaissance de l'article scientifique qui se rapporte à cette étude dans le chapitre II ainsi que la discussion, les perspectives futures et les conclusions générales de l'étude dans le chapitre III.

CHAPITRE II
EFFECTS OF 4-HYDROXYTAMOXIFEN, RALOXIFENE AND ICI 182 780 ON
CELL PROLIFERATION OF UTERINE CANCER CELL LINES IN THE
PRESENCE AND THE ABSENCE OF ESTROGENS

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre II sont : moi-même, 1^{er} auteur, j'ai effectué la majeure partie des expérimentations, le traitement des données et la rédaction, Émilie Sexton, 2^e auteur, dont certains résultats des figures 5 à 8 sections A) et B) lui sont attribuables, Sophie Parent, 3^e auteur, dont les résultats de la figure 9 lui sont entièrement attribuables, Marie-Claude Déry, 4^e auteur, dont les résultats de la figure 4 lui sont totalement attribuables, Virginie Boucher, 5^e auteur, dont les résultats des figures 5 à 8 sections C) et D) ont été effectués en partie par elle, et finalement, Éric Asselin, dernier auteur, qui a élaboré la stratégie expérimentale, effectué la supervision des travaux ainsi que la révision de cet article.

RÉSUMÉ

Les effets du 17β -oestradiol et des anti-estrogènes sur des cellules cancéreuses utérines sont très peu compris. Le but de cette étude était de déterminer l'impact du 17β -oestradiol, 4-hydroxytamoxifène, raloxifène et le ICI 182 780 sur la prolifération cellulaire de six lignées cellulaires cancéreuses de l'utérus : HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa et EN-1078D. Les effets de ces composés sur la prolifération cellulaire des six lignées cellulaires cancéreuses de l'utérus ont été étudiés en présence et en absence d'estrogènes (rouge de phénol et sérum déprivé en stéroïdes sexuels). Nos résultats démontrent l'importance de soustraire le rouge de phénol et de dépriver le sérum lorsque l'on étudie des cellules cancéreuses utérines en relation avec le 17β -oestradiol. De manière générale, le 17β -oestradiol et le 4-hydroxytamoxifène ont démontré des similarités dans leurs effets agonistes tandis que le raloxifène a présenté différents patrons de prolifération cellulaire (agoniste/antagoniste) et le ICI 182 780 a montré une activité principalement antagoniste des estrogènes. Nous avons observé que chacune des lignées cellulaires avait des expressions différentes du $ER\alpha$, du $ER\beta$, du GPR30 et du REA et aussi, elles réagissaient différemment aux divers traitements. L'affinité de chaque composé pour fixer le $ER\alpha$ et le $ER\beta$ était très similaire avec l'exception du raloxifène qui a une préférence pour la fixation du $ER\alpha$. La phosphorylation/activité a été réduite chez les cellules cultivées dans un milieu de culture sans rouge de phénol et sans stéroïde. Nos résultats suggèrent que la présence du $ER\alpha$, du $ER\beta$, du GPR30 et du REA joue un rôle dans la réponse proliférative des cellules au 17β -oestradiol et aux anti-estrogènes, mais ils ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans ce mécanisme.

Effects of 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on cell proliferation of uterine cancer cell lines in the presence and the absence of estrogens [†]

Kim Leblanc, Émilie Sexton, Sophie Parent, Marie-Claude Déry, Virginie Boucher and
Eric Asselin*.

Department of Chemistry and Biology, Research Group in Cellular and Molecular
Biopathology, University of Quebec in Trois-Rivieres, C.P. 500, Trois-Rivieres,
Quebec, Canada G9A 5H7

Running title : Antiestrogens impact on uterine cancer cells proliferation.

Key words : ER α , ER β , GPR30, REA, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene, ICI 182 780,
phenol red, cell proliferation and endometrial cancer.

*Corresponding Author : Eric Asselin, Ph.D.
Department of Chemistry and Biology
Medical Biology Section
University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500
Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7
E-mail : Eric.Asselin@uqtr.ca

[†]This work has been supported by a grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Eric Asselin is a recipient of the fellowship from FRSQ. Kim Leblanc is a recipient of a CIRH and FRSQ scholarship. Émilie Sexton and Marie-Claude Déry is a recipient of a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) scholarship.

ABSTRACT

17 β -estradiol and antiestrogens effects on uterine cancer cells are poorly understood. The aim of this study was to determine the impact of 17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on cell proliferation of six uterine cancer cell lines : HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and EN-1078D. The effects of these compounds on cell proliferation of the six uterine cancer cell lines were studied in the presence and the absence of estrogens (phenol red and serum deprivation of sex steroids). Results demonstrated the importance of removing phenol red and the use of sex steroid-deprived serum when studying uterine cancer cells in relationship with 17 β -estradiol. In a general manner, 17 β -estradiol and 4-hydroxytamoxifen showed similarities in their agonistic effects whereas raloxifen showed different pattern of cell proliferation (agonistic/antagonistic) and ICI 182 780 had antagonistic activity. We observed that each cell line had diverse expression of ER α , ER β , GPR30 and REA and also reacted differently to the treatments. Affinity of each compound to the binding of ER α and ER β was very similar with the exception of raloxifen that had a preference for ER α binding. Akt phosphorylation/activity was reduced in cells cultured in a phenol red and steroids free culture medium. Our results suggest that the presence of ER α , ER β , GPR30 and REA have a role to play in the proliferative response of cells to 17 β -estradiol and antiestrogens but are not the only factors involved in this process.

INTRODUCTION

Estrogens stimulate many biosynthetic processes in hormone-responsive cells such as in breast and uterus (Aitken et Lippman 1985; Katzenellenbogen et al. 1979; Katzenellenbogen et al. 1985) and are known to play a major role in the etiology of breast and endometrial cancer (Henderson et al. 1982; Henderson et al. 1988). Worldwide, the incidence of breast cancer is the first in importance of all female cancers whereas endometrial cancer is the fourth (Parkin et al. 2005).

The importance of estrogens was extensively studied in the past two decades, in particular using breast cancer cell lines. Concerned with the elimination of exogenous sources of estrogens in cell culture media, researchers deprived sera of steroid hormones (Darbre et al. 1983; Leake et al. 1987) and in spite of this elimination, cell proliferation seems to be affected by another estrogenic source. After an examination of the potential sources of estrogens, Berthois et al. (1986) demonstrated that phenol red, used in media as a pH indicator, had estrogenic properties at concentration, found in tissue culture media; it binds to estrogen receptors causing significant stimulation of cell proliferation and specific protein synthesis in cells responding to estrogens. After this finding, it was suggested, in any case of studying estrogen-responsive cells, to consider the estrogenic activity of phenol red (Berthois et al. 1986).

Estrogens can act in target cells by two mechanisms: a genomic or classical mechanism and a non-genomic or rapid mechanism. The first mechanism involves the estrogen receptors (ER), proteins to which estrogen binds after its intra-cellular diffusion (Tsai et O'Malley 1994). Consecutive to its binding to estrogen, a conformational change appears in the ER, permitting interactions with transcriptional co-regulators and regulatory DNA sequences of target genes (Hewitt et al. 2005; Tsai et O'Malley 1994). A physiological response within hours following the estrogen exposure takes place in consequence of synthesis in proteins and mRNAs that DNA sequences encode (Hewitt et al. 2005). The non-genomic mechanism gives response to estrogen within seconds or minutes by a direct effect on proteins and on certain signalling pathways which suggests that this mechanism is membrane-mediated (Hewitt et al. 2005; Norman et al. 2004).

ER belong to the nuclear receptor superfamily of transcription factors and has two isoforms named alpha (ER α) and beta (ER β) (Bjornstrom et Sjoberg 2004; Pearce et Jordan 2004). The human ER α was first cloned in 1986 (Green et al. 1986; Greene et al. 1986; Walter et al. 1985) whereas, human ER β was cloned in 1996 (Enmark et al. 1997; Mosselman et al. 1996). Those two isoforms are expressed in breast and uterus tissues (Gustafsson 1999; Pearce et Jordan 2004). Recently, a new receptor in the G protein-coupled receptors (GPCR) family was discovered, termed GPR30 (Carmeci et

al. 1997). This receptor presented all characteristics of a membrane estrogen receptor including the capacity to bind estrogens (Thomas et al. 2005).

The ER activity is influenced not only by the binding of estrogen but also by coregulator proteins. These proteins can act like coactivators to enhance or, like corepressors, to repress transcriptional activity (McKenna et al. 1999; Pearce et Jordan 2004). Recently, a new repressor of estrogen receptor activity named REA was identified (Montano et al. 1999). This protein represses the transcriptional activity of ER only and no other steroid or non-steroid nuclear receptors (Montano et al. 1999).

Antiestrogens are compounds that compete with estrogens to bind the ER, but are unable to activate it (Katzenellenbogen et al. 1997; Webster et al. 1988). Tamoxifen (NolvadexTM) and raloxifene (EvistaTM) are selective estrogen receptor modulators (SERMs); they can exert an agonistic or antagonistic action to estrogens depending of the target tissue (Haskell 2003; Pike et al. 2001). Tamoxifen is widely used in the prevention and the treatment of breast cancer (Fisher et al. 1998; MacGregor et Jordan 1998; Taylor et Taguchi 2005; Ugwumadu et al. 1998). However, the long term use of tamoxifen increases endometrial cancer risk (Fisher et al. 1994; Fornander et al. 1989). Raloxifene, developed at origin for breast cancer therapy (Brown 2002), is now given to patients in prevention and treatment of osteoporosis (Delmas et al. 1997; Goldstein 2001) and appears to be safe for the endometrium (Cummings et al. 1999; Delmas et al. 1997). ICI 182 780 (FaslodexTM) is another kind of antiestrogens that have only an antagonistic action to estrogens and is called a pure antiestrogen (Wakeling et al. 1991). The latter compound can be use in case of localized advance or metastasis breast cancer in menopausal women (de Cremoux et al. 2004) or in case of developing a resistance to tamoxifen treatment (Howell et Robertson 1995).

In the past, most attention has been paid on breast cancer when studying estrogens and antiestrogens effects whereas tamoxifen exerts estrogenic effects on uterine tissues. We used six uterine cancer cell lines to investigate and establish links between the expression or not of ER and the impact of 17 β -estradiol and antiestrogens (4-

hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780) on cell proliferation in presence and in absence of estrogens (sex steroids deprived serum and phenol red-free media).

We have characterized the effect of 17β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on cell proliferation of six uterine cancerous cell lines (HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa and EN-1078D). Affinity of each compound to ER were determined by binding assay. The expressions of the two ER isoforms at mRNA and protein levels were characterized. Messenger RNA abundance of GPR30 and REA were also determined. The presence of the active form of Akt (phospho-Akt) was also measured. All experiments were carried out in presence and in absence of estrogens. Finally, we established the links between the presence of each isoform of the ER and the effect obtained with each compound on cell proliferation of the uterine cancer cells in the presence and the absence of estrogens.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

17β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), charcoal activated and dextran were purchased from Sigma (St-Louis, MO). Raloxifene was obtained from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON). ICI 182 780 was purchased from TOCRIS (Ellisville, MO). DMEM/F12 with phenol red and without phenol red containing HEPES, McCoy's, RPMI, BGS, FBS and PCR primers were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). DMEM/F12 without phenol red was bought from Hyclone (Logan, UT). Anti-ER α Ab-15 (Clone AER611) and anti-ER β Ab-24 were purchased from Lab Vision (Fremont, CA). Akt and phospho-Akt antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). HitHunterTM EFC Estrogen Fluorescence Assay Kit was obtained from Discoverx (Fremont, CA).

Cell culture

Human endometrial (HEC-1-A, KLE, RL-95-2) and cervical (HeLa) cancer cells were obtained from ATCC (Manassas, VA). Human endometrial Ishikawa cells were generously provided by Dr Sylvie Mader, Université de Montréal, Canada. EN-1078D was characterized by our group (Dery et al. 2006). Cells were cultured in 25 or 75 cm² flasks at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

In the presence of estrogens, all media contained phenol red. HeLa, KLE, Ishikawa and EN-1078D cells were maintained in DMEM/F12 supplemented with 2.438 g/L (1.34 g/L for KLE) of NaHCO₃, 2% BGS (10% FBS for KLE) and 50 µg/mL gentamycin. HEC-1-A cells were grown in McCoy's supplemented with 2.2 g/L of NaHCO₃, 5% BGS, and 50 µg/mL gentamycin. RL-95-2 cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 1.75 g/L of NaHCO₃, 10% of BGS, 5 µM HEPES, 2.5 µg/mL insulin and 50 µg/mL gentamycin.

In the absence of estrogens, all media were phenol red-free. HeLa, KLE, Ishikawa and EN-1078D cells were maintained in DMEM/F12 supplemented with 2% FBS depleted of sex steroids by dextran-charcoal extraction (FBS-DC) (10% for KLE) and 50 µg/mL gentamycin. HEC-1-A cells were grown in RPMI supplemented with 5% FBS-DC treated and 50 µg/mL gentamycin. RL-95-2 cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 15 µM HEPES, 10% FBS-DC treated and 50 µg/mL gentamycin.

MTT proliferation assay

In the presence of estrogens. Cells were plated in 96-wells plates in their respective media. At 60% confluence, cells were cultured for 24 and 48 h in the presence of different concentrations of 17β-estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene or ICI 182 780 in their respective media without serum.

In the absence of estrogens. Cells were plated in 96-wells plates in their respective media. At 60% confluence, media was changed for media without serum for 24 h. Cells were then cultured for 24 and 48 h in the presence of different concentrations of 17β-estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene or ICI 182 780 in their respective media without serum.

In both experiments. 4 h before the end of the culture period, 10 μ L of MTT (5 mg/mL) was added in each well. At the end of the cultured period, 100 μ L/well of solubilization solution was added (10% SDS in 0.01 M HCl). The microplate was incubated overnight at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. The OD was read with the FluoSTAR OPTIMA (BMG Labtechnologies Inc.; Durham, CN) between 550 and 600 nm. The results are presented as a percentage of cell proliferation in comparison with control cells (e.g. untreated).

Protein extraction and Western analysis

Cells were trypsinized, lysed in RIPA lysis buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, complete mini; protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN), frozen/thawed three times, then centrifuged (13000 x g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein concentration was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, Mississauga, ON). 50 μ g of protein extracts were heated at 95°C for 3 min, resolved by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrotransferred to nitrocellulose membranes at 15 V for 30 min using a semidry transfer system (Bio-Rad). The membranes were then blocked for 2 h at RT with PBS containing 5% milk powder and 0.05% Tween, then incubated with anti-ER α (1:500), anti-ER β (1:2000), anti-Akt (1:2000) or anti-pAkt (1:1500) overnight at 4°C and subsequently with Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit (1:4000) or anti-mouse (1:2500) secondary antibodies for 45 min at RT. Peroxidase activity was visualized with the Super signal[®] West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Arlington Heights, IL) according to the manufacturer's instructions.

RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted with the TRIzol[®] reagent (Life Technologies) according to recommendation of the manufacturer. 0.4 μ g of total RNA was used for preparation of the first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated at 65°C for 10 min with 2 μ L oligot dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10 μ L. Samples were then incubated at 37°C for 60 min in 20 μ L of reaction buffer

(1X) containing 10 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) and 10 U Muloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT). After cDNA synthesis, the reaction volumes were brought up to 60 μ L with RNase-DNase free water. A negative control was also included, using the same reaction mixture but without RNA to ensure absence of any contaminating genomic DNA in the RNA template.

Human ER α mRNA NM_000125; gi:62821793; 264 pb (1504-1768 pb) was amplified using sense primer 5'-GTGCCTGGCTAGAGATCCTG-3' and antisense primer 5'-AGAGACTTCAGGGTGCTGGA-3'. For ER β mRNA, the expression was determined by amplification of NM_001437; gi:10835012; 172 pb (1358-1530 pb) and the sequence of the primers were 5'-AAGAAGATTCCCGGCTTTGT-3' (sense) and 5'-TCTACGCATTTCCCTCATC-3' (antisense). Expression of GPR30 was determined by amplification of NM_001505; gi:4504090; 187 pb (1633-1820 pb). Amplification were carried out using the sense upstream sequence 5'-CTCCAACAGCTGCCTAAACC-3' and the antisense downstream sequence 5'-TCTACACGGCACTGCTGAAC-3'. REA mRNA AF150962; gi:5020252; 396 pb (385-781 pb) was amplified using sense primer 5'-CGAAAAATCTCCTCCCCTACA-3' and antisense primer 5'-CCTGCTTTGCTTTTCTACCA-3'. Human β -actin mRNA was amplified by the sense primer 5'-GAGGATCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGGTC-3' and the antisense primer 5'-CAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCA-3'. Each reaction mixture (final volume 50 μ L) contains 5 μ L RT template or negative control, 2.5 μ L each primer, 5 μ L ThermoPol buffer (New England Biolabs; Mississauga, ON), 2 μ L dNTPs and 0.3 μ L Taq polymerase (New England Biolabs). The PCR cycling conditions chosen were 1) 30 s at 94°C, 2) 30 s at 66°C (ER α), at 58°C (ER β , GPR30 and REA), 3) 30 s at 72°C for 35 cycles (REA), 40 cycles (ER α , ER β , GPR30). β -actin was used as the control reaction. Reaction products were analyzed on 1.0% agarose gels. Amplified DNA fragments were visualized by ethidium bromide or SYBR safe™ DNA gel stain (Molecular Probes, Eugene, OR) staining. Densitometry was determined with the Quantity One software version 4.5.2 (Bio-Rad).

ER Binding assay

The HitHunterTM Enzyme Fragment Complementation (EFC) Estrogen Fluorescence Assay Kit was performed according to the manufacturer's instructions (Discoverx (Fremont 2005)). Briefly, the principle refers to the detection of a target of interest by controlling the complementation of two inactive β -galactosidase enzyme fragments termed Enzyme donor (ED) and Enzyme acceptor (EA) with a binding protein. A target of interest can be covalently attached to ED, minimally affecting its structure and function. Unknown targets and ED conjugate compete for binding to a target specific binding protein. Unbound ED will recombine with EA to form active β -galactosidase enzyme that is quantified by substrate hydrolysis. The signal generated is proportional to the concentration of bound target.

Statistical analysis

All experiments were repeated a minimum of three times. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA) or Student's *t* test. Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Expression of mRNA genes

To determine the abundance of ER α , ER β , GPR30 and REA mRNAs in human uterine cancerous cell lines, RT-PCR have been carried out using specific primers chosen from human DNA sequences and amplified with the PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA).

In the presence of estrogens, the ER α expression was detected in all cell lines, weakly in HEC-1-A cells and highly in HeLa, Ishikawa and EN-1078D cells (Fig.1 A). In the absence of estrogens, the presence of ER α was weakly observed in HeLa, HEC-1-A, KLE and RL-95-2 cells compared to Ishikawa and EN-1078D cells. A significant difference was observed between EN-1078D in the presence and the absence of estrogens ($P < 0.05$). EN-1078D expression of ER α increased in absence of estrogens.

ER β mRNA abundance was detected in the six cell lines in the presence of estrogens, mostly in RL-95-2 and Ishikawa cells and poorly in EN-1078D cells (Fig.2 A). In the absence of estrogens, the ER β expression was reduced in all cell lines in comparison with the presence of estrogens and Ishikawa cells had the highest expression.

The expression of GPR30 was observed in all uterine cancer cells with no significant difference in the presence of estrogens (Fig.3 A). In the absence of estrogens compared to the presence, basal mRNA level of GPR30 was reduced in all cells. The REA mRNA was detected in all cell lines without significant difference in the presence and the absence of estrogens (Fig.3 B).

Protein expression

In order to confirm the results obtained with basal levels of mRNAs for ER α and ER β , Western blot analyses were carried out to detect the presence of ER α and ER β proteins. In the presence of estrogens, surprisingly, ER α protein was only detected in EN-1078D cells whereas all cell lines presented mRNA at different level (Fig.1 B). In the absence of estrogens, this protein was observed in Ishikawa and predominantly in EN-1078D cell lines. ER β protein was present in all uterine cell lines but predominant in HeLa cells and this was observed in both the presence and the absence of estrogens (Fig.2 B). To verify if the levels of ER proteins can be modulate by 17 β -estradiol, time course experiments were carried out on 0, 5, 15, 60, 120 minutes and 24, 48 hours with 10⁻⁸ M of 17 β -estradiol in the absence of estrogens with HeLa and EN-1078D cells. Results showed no significant variation in the ER α and ER β protein level expression (data not shown).

Akt has been shown to be regulated by estradiol in different systems and we sought to determine is the constitutive expression of phospho-Akt (the active form of Akt) in mutated PTEN cells (RL-95-2 and Ishikawa) might be influenced in the presence or absence of endogenous estrogens (Fig.4). The results showed that total Akt protein is not influenced by estrogens but clearly showed a reduction of Akt phosphorylation in cells cultured in a phenol red and steroids free culture medium. In wild type PTEN cells

(HeLa and HEC-1-A) the presence of phospho-Akt is weakly detectable in a culture medium without phenol red containing steroid free serum.

Cell proliferation

The conversion of MTT to formazan by metabolically active cells was used to measure the effect of 17β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on cell proliferation of the six cell lines studied.

In the presence of estrogens, results obtained by MTT assay showed that 17β -estradiol, at low doses (10^{-10} to 10^{-8} M) after 24 h treatment, increased cell proliferation of three cell lines (HeLa, KLE and Ishikawa) and had no effect on the other cell lines (Fig.5 A and B). At higher concentrations (10^{-7} to 10^{-5} M), 17β -estradiol reduced cell proliferation of all cell lines tested except at 48 h and at 10^{-5} M where proliferation of RL-95-2 cells was slightly increased. 4-hydroxytamoxifen caused an increase of cell proliferation in HeLa, Ishikawa and EN-1078D cells at 24 h but at 10^{-5} M a major decrease of cell proliferation in all cell lines studied was observed at 24 and 48 h (Fig.6 A and B). Results obtained with the compound raloxifene showed little increase of cell proliferation in all cell lines except HeLa, HEC-1-A and RL-95-2 with doses 10^{-10} to 10^{-6} M whereas at 10^{-5} M an important augmentation of cell proliferation appears in HEC-1-A, KLE and RL-95-2, in contrast with the other cell lines that are decreasing (Fig.7 A and B). ICI 182 780 augmented cell proliferation at low doses (10^{-10} to 10^{-8} M) of HeLa, RL-95-2 and Ishikawa cells, but at higher doses, all cell lines decreased in proliferation gradually (Fig.8 A and B). At 10^{-5} M of ICI 182 780, only KLE and RL-95-2 cells continued to decrease compared to the other cell lines that showed a significant increase of cell proliferation.

In the absence of estrogens, results obtained by MTT assay with 17β -estradiol increased cell proliferation in most of the cell lines at low doses (10^{-10} to 10^{-8} M) and decreased cell proliferation at high doses (10^{-7} to 10^{-5} M) after 24 h (Fig.5 C and D). After 48 h, the same pattern of growth was observed but the reduction of cell proliferation was delayed for a majority of the cell lines. HeLa and KLE cells were the exception showing an increase of cell proliferation at 48 h. Results with 4-hydroxytamoxifen at 24 and 48 h of treatments showed a biphasic effect similar to 17β -

estradiol at 24 h with all cell lines excepting HeLa cells at 48 h which presented the same pattern as their response to 17 β -estradiol (Fig.6 C and D). Treatments for 24 h with raloxifene demonstrated a relatively stable cell proliferation pattern in all cell lines that highly increased in KLE, RL-95-2, Ishikawa and EN-1078D cell lines at 10⁻⁵ M (Fig.7 C and D). After 48 h in the presence of raloxifene, cell proliferation of RL-95-2 decreased compared to 24 h. KLE and EN-1078D cells showed a gradual increased of cell proliferation. The proliferation of HeLa and Ishikawa cells was highly increased at high doses. Results obtained by MTT assay with ICI 182 780 at 24 and 48 h, showed a biphasic effect of cell proliferation with each cell line except at 48 h when HeLa cells constantly increased and Ishikawa cells demonstrated an alternance of augmentation and reduction of cell proliferation (Fig.8 C and D).

ER binding assay

To evaluate the affinity of 4-hydroxytamoxifen, raloxifene, ICI 182 780 for ER, the ER α and ER β affinity assay was performed using the HitHunterTM EFC Estrogen Fluorescence Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Discoverx (Fremont 2005)).

The ER α binding studies showed a strong affinity of the three antiestrogens for the ER α (Fig.9 A). The IC₅₀ of the antiestrogens obtained were 0.976 nM with 4-hydroxytamoxifen, 0.659 nM with raloxifene and 0.801 nM with ICI 182 780 compared to 0.675 nM with 17 β -estradiol, the natural ligand.

Results obtained for the ER β binding affinity demonstrated a high affinity of the antiestrogens 4-hydroxytamoxifen and ICI 182 780 only (Fig.9 B). Corresponding IC₅₀ were 2.46 nM for 4-hydroxytamoxifen and 1.12 nM for ICI 182 780, compared to 1.01 nM with 17 β -estradiol. With raloxifene the IC₅₀ was not reached.

DISCUSSION

Although antiestrogens are widely used for the prevention and the treatment of long-term effects of estrogens deficiency like osteoporosis or estrogens-responsive cancers like breast cancer, their effects on uterine cancer remains poorly understood. In

the present study, we have examined the effects of 17β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on the proliferation of six uterine cancerous cell lines in the presence and the absence of estrogens.

Differences between cellular proliferation in the presence and the absence of estrogens were readily observable. This is in accordance with the results obtained in breast cancer cells (Berthois et al. 1986) and also in human endometrial cells (David et al. 1990). Our present results, thus confirm the importance of considering phenol red from media and estrogens from serum in any investigation using estrogen-responsive cells and demonstrated this importance in uterine cancer cell lines.

We have demonstrated that 17β -estradiol and 4-hydroxytamoxifen showed similarities in their effects on uterine cancer cell proliferation; most of these cell lines proliferate at low doses while proliferation decreases at high doses in the presence of those compounds. This is consistent with the fact that tamoxifen act like an agonist of estrogens on endometrium (Fisher et al. 1994; Fornander et al. 1989). Interestingly, raloxifene presented agonistic/antagonistic pattern of cell proliferation depending on doses with the uterine cell lines whereas ICI 182 780 exerted mostly antagonistic action as expected for a pure antiestrogen.

The relative expression levels of the two estrogen receptors subtypes in a particular tissue was suggested to influence estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs) activities (McDonnell 2004). To examine their implication on cell proliferation, mRNA/proteins expressions were measured in all cell lines in the presence and the absence of estrogens. $ER\alpha$ was present in EN-1078D cells in the presence and absence of estrogens, and in Ishikawa cells the $ER\alpha$ was only present in the absence of estrogens whereas no other cell lines produced this isoform of the ER. $ER\beta$ was evenly produced in all cell lines in the presence and the absence of estrogens but at higher level in HeLa cells than others. The present results on ER subtypes showed differences in their level of ER expression compared to the results obtained by other studies with the same cell lines (Jana et al. 1999; Jones et al. 1999; Monje et Boland 2002; Vivacqua et al. 2005) demonstrating that the conditions of cells maintenance have an impact on ER

expression as we have observed in the presence and the absence of estrogens with Ishikawa cells.

For the first time with certain cell lines, GPR30 and REA mRNAs were measured and no difference between the presence and absence of estrogens was observed. The GPR30 expression suggests that these cells permit non-genomic actions of estrogens whereas they already allow the genomic actions. A recent study, demonstrated that GPR30 participated in the mediation of cell proliferation induced by 17 β -estradiol and 4-hydroxytamoxifen in HEC-1-A and Ishikawa cell lines (Vivacqua et al. 2005). Thus, it is important to determine the exact role and involvement of GPR30 observed following the treatment with 17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 in the proliferation of uterine cancer cells. REA was never measured in the uterine cancer cell lines studied before. The expression of REA by all cells suggests that REA could play a role in the mediation of 17 β -estradiol and antiestrogens effects and further investigations would be necessary to better define this role. REA action had been describe to be via a competition with the co-activator of steroids receptors, SRC-1 (Montano et al. 1999), and consequently, the expression of this co-activator expression has to be measure in the future to clarify our comprehension of the mechanisms of 17 β -estradiol and antiestrogens action. On the other side, Akt activity was significantly reduced in all cell lines studied in the estrogen free medium indicating that phenol red and steroids present in the serum influence the activity of this proliferation and survival pathway. Low levels of phospho-Akt was detected in cells expressing wild type PTEN in the regular culture medium and completely absent in the estrogen free medium. These results show that it will be important in the future to consider the effect of exogenous estrogens when studying the PI 3K/PTEN/Akt survival pathway.

In the presence of high levels of ER α , in EN-1078D cells for instance, we observed a rapid increase in proliferation with the four compounds studied in the absence of estrogens. Those cells were probably already stimulated for cell proliferation by phenol red in the presence of estrogens. Phenol red presence was shown to affect the basal level of hormone-stimulated responses and the degree to which exogenous

estrogens is able to stimulate these responses above the basal level (Berthois et al. 1986). In general, EN-1078D cells are the most affected cells by 17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 suggesting that ER α is important in the response of cell proliferation induced by the compounds studied. In comparison with EN-1078D cells, Ishikawa cells that produced ER α only in the absence of estrogens showed few differences in the effects of the compounds studied between the presence and the absence of estrogens. Perhaps, the augmentation of ER α production in the absence of estrogens is not enough to observe an important change in response to the compounds studied. The production of ER α in Ishikawa cells only in the absence of estrogens, probably results in a survival engagement of cells in response to the lack of nutrients to increase the chances of growth stimulations. An augmentation of ER α levels in the absence of estrogens was also described in MCF-7 cells (Katzenellenbogen et al. 1987; Welshons et al. 1987).

In the presence of high levels of ER β and not significant levels of ER α present, like in HeLa cells, we observed a significant cell proliferation in response to the four compounds studied at higher doses compared with other cell lines. Those results suggest a relationship between ER β and cell proliferation. To date, the role of ER β is poorly defined in uterine cancer. In contrast to our observations on uterine cancer cell lines, as seen in the breast cancer cell line MCF-7, ER β inhibits cell proliferation (Paruthiyil et al. 2004) and ER β level is reduced in the carcinogenesis of breast cancer suggesting that ER β is protective against cancer development and thus on cell proliferation (Park et al. 2003). Further investigations concerning the involvement of ER β in uterine cell proliferation have to be carried out.

The three other cell lines, HEC-1-A, KLE and RL-95-2, are also influenced by 17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 but they appear to be more resistant than the other cell lines. These cells have in common the expression of GPR30, REA and ER β and the absence of ER α expression. The mechanism implicated in this resistance is unclear at present and further investigations are needed to understand

this result. Certain signalling pathways could be the key of this mechanism of resistance. It was already demonstrated that Akt in the PI 3-K pathway was involved in the cisplatin resistance of the KLE cells (Gagnon et al. 2004). Thus, it will be important to verify the implication of the PI 3-K pathway and others signalling pathways in the results we have obtained on cell proliferation with the four compounds studied.

Our results demonstrate that the affinity of the three antiestrogens are sensibly the same and closer to 17β -estradiol with each ER isoforms except raloxifene which has higher binding affinity for ER α , this in accordance with results reported in the literature (Haskell 2003; Wakeling et al. 1991). Surprisingly, raloxifene had an impact on cell proliferation of all cell lines and not only in cells that express ER α . Oddly, in most of the cell lines studied, raloxifene at very high doses exerts an important increase in cell proliferation especially in HeLa cells expressing high levels of ER β . Studies with Ishikawa cells also demonstrated that raloxifene increased cell proliferation at high concentrations (Boostanfar et al. 2003; Hibner et al. 2004). It can be interesting to investigate the binding affinity of these three antiestrogens studied with GPR30 to verify if raloxifene can exert a major increase of cell proliferation at high doses through GPR30.

Taken together, those results suggest that ER α and ER β have a role to play in the response to 17β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 but are not the only molecules involved. GPR30 and REA, characterized for the first time in uterine cancer cell lines, could play a role in those effects but there is other players that have to be defined. 4-hydroxytamoxifen acts like an agonist of 17β -estradiol on uterine cancer cells whereas raloxifene exerts partial agonistic/antagonistic activity and ICI 182 780 had mostly antagonistic action. In studying the action of estrogens and antiestrogens in uterine cancer cell lines, phenol red and exogenous steroids have to be considered. Likely, further studies are necessary to understand the exact mechanism(s) of action of 17β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 in these six uterine cancer cell lines.

REFERENCES LIST

- Aitken, S. C. and Lippman, M. E. "Effect of estrogens and antiestrogens on growth-regulatory enzymes in human breast cancer cells in tissue culture", *Cancer Res.* 45, 4: 1611-1620, (1985).
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., and Katzenellenbogen, B. S. "Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 8: 2496-2500, (1986).
- Bjornstrom, L. and Sjoberg, M. "Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling", *Nucl.Recept.* 2, 1: 3-(2004).
- Boostanfar, R., Amezcua, C. A., Tourgeman, D. E., Roy, S., Felix, J. C., and Stanczyk, F. Z. "Growth effects of raloxifene, estradiol, medroxy-progesterone acetate, and progesterone on human endometrial adenocarcinoma cells", *Fertil.Steril.* 79, 1: 223-225, (2003).
- Brown, K. "Breast cancer chemoprevention: risk-benefit effects of the 'antioestrogen tamoxifen", *Expert.Opin.Drug Saf* 1, 3: 253-267, (2002).
- Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., and Weigel, R. J. "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer", *Genomics* 45, 3: 607-617, (1997).
- Cummings, S. R., Eckert, S., Krueger, K. A., Grady, D., Powles, T. J., Cauley, J. A., Norton, L., Nickelsen, T., Bjarnason, N. H., Morrow, M., Lippman, M. E., Black, D., Glusman, J. E., Costa, A., and Jordan, V. C. "The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation", *JAMA* 281, 23: 2189-2197, (1999).
- Darbre, P., Yates, J., Curtis, S., and King, R. J. "Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture", *Cancer Res.* 43, 1: 349-354, (1983).
- David, J. F., Marques, B., Maisongrosse, V., Jozan, S., and Mazabrey, D. "Weak direct proliferative action of estradiol on human endometrial cells in culture", *Bull.Assoc.Anat.* 74, 224: 51-55, (1990).
- de Cremoux, P., Dieras, V., Poupon, M. F., Magdelenat, H., Sigal-Zafrani, B., Fourquet, A., and Pierga, J. Y. "Tamoxifen and aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in menopausal women: pharmacological and clinical aspects", *Bull.Cancer* 91, 12: 917-927, (2004).
- Delmas, P. D., Bjarnason, N. H., Mitlak, B. H., Ravoux, A. C., Shah, A. S., Huster, W. J., Draper, M., and Christiansen, C. "Effects of raloxifene on bone mineral

density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women", *N.Engl.J.Med.* 337, 23: 1641-1647, (1997).

Dery, M. C., Provencher, D., Mes-Masson, A. M., and Asselin, E. "Characterization of a poorly differentiated human endometrial carcinoma cell line: EN-1078D", not publised, (2006).

Discoverx (Fremont, CA "The HitHunter™ EFC Estrogen Fluorescence Assay kit", <http://www.discoverx.com>, (2005).

Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., and Gustafsson, J. A. "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern", *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, 12: 4258-4265, (1997).

Fisher, B., Costantino, J. P., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., and Cronin, W. M. "Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14", *J.Natl.Cancer Inst.* 86, 7: 527-537, (1994).

Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., and Wolmark, N. "Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study", *J.Natl.Cancer Inst.* 90, 18: 1371-1388, (1998).

Fornander, T., Rutqvist, L. E., Cedermark, B., Glas, U., Mattsson, A., Silfversward, C., Skoog, L., Somell, A., Theve, T., and Wilking, N. "Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers", *Lancet* 1, 8630: 117-120, (1989).

Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., and Asselin, E. "AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells", *Gynecol.Oncol.* 94, 3: 785-795, (2004).

Goldstein, S. R. "The effect of SERMs on the endometrium", *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 949, 237-242, (2001).

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., and Chambon, P. "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A", *Nature* 320, 6058: 134-139, (1986).

Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA", *Science* 231, 4742: 1150-1154, (1986).

Gustafsson, J. A. "Estrogen receptor beta-a new dimension in estrogen mechanism of action", *J.Endocrinol.* 163, 3: 379-383, (1999).

- Haskell, S. G. "Selective estrogen receptor modulators", *South.Med.J.* 96, 5: 469-476, (2003).
- Henderson, B. E., Ross, R., and Bernstein, L. "Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture", *Cancer Res.* 48, 2: 246-253, (1988).
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C., and Casagrande, J. T. "Endogenous hormones as a major factor in human cancer", *Cancer Res.* 42, 8: 3232-3239, (1982).
- Hewitt, S. C., Deroo, B. J., and Korach, K. S. "Signal transduction. A new mediator for an old hormone?", *Science* 307, 5715: 1572-1573, (2005).
- Hibner, M., Magrina, J. F., Lefler, S. R., Cornella, J. L., Pizarro, A. R., and Loftus, J. C. "Effects of raloxifene hydrochloride on endometrial cancer cells in vitro", *Gynecol.Oncol.* 93, 3: 642-646, (2004).
- Howell, A. and Robertson, J. "Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer", *Lancet* 345, 8955: 989-990, (1995).
- Jana, N. R., Sarkar, S., Ishizuka, M., Yonemoto, J., Tohyama, C., and Sone, H. "Role of estradiol receptor- α in differential expression of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible genes in the RL95-2 and KLE human endometrial cancer cell lines", *Arch.Biochem.Biophys.* 368, 1: 31-39, (1999).
- Jones, P. S., Parrott, E., and White, I. N. "Activation of transcription by estrogen receptor α and β is cell type- and promoter-dependent", *J.Biol.Chem.* 274, 45: 32008-32014, (1999).
- Katzenellenbogen, B. S., Bhakoo, H. S., Ferguson, E. R., Lan, N. C., Tatee, T., Tsai, T. S., and Katzenellenbogen, J. A. "Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissues and tumors", *Recent Prog.Horm.Res.* 35, 259-300, (1979).
- Katzenellenbogen, B. S., Kendra, K. L., Norman, M. J., and Berthois, Y. "Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens", *Cancer Res.* 47, 16: 4355-4360, (1987).
- Katzenellenbogen, B. S., Miller, M. A., Mullick, A., and Sheen, Y. Y. "Antiestrogen action in breast cancer cells: modulation of proliferation and protein synthesis, and interaction with estrogen receptors and additional antiestrogen binding sites", *Breast Cancer Res.Treat.* 5, 3: 231-243, (1985).
- Katzenellenbogen, B. S., Montano, M. M., Ekena, K., Herman, M. E., and McInerney, E. M. "William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer", *Breast Cancer Res.Treat.* 44, 1: 23-38, (1997).

- Leake, R. E., Freshney, R. I., and Munir, I. "Steroid response in vivo and in vitro", IRL Press, 6: 205-235, (1987).
- MacGregor, J. I. and Jordan, V. C. "Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action", *Pharmacol.Rev.* 50, 2: 151-196, (1998).
- McDonnell, D. P. "The molecular determinants of estrogen receptor pharmacology", *Maturitas* 48 Suppl 1, S7-12, (2004).
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology", *Endocr.Rev.* 20, 3: 321-344, (1999).
- Monje, P. and Boland, R. "Expression and cellular localization of naturally occurring beta estrogen receptors in uterine and mammary cell lines", *J.Cell Biochem.* 86, 1: 136-144, (2002).
- Montano, M. M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., and Katzenellenbogen, B. S. "An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12: 6947-6952, (1999).
- Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor", *FEBS Lett.* 392, 1: 49-53, (1996).
- Norman, A. W., Mizwicki, M. T., and Norman, D. P. "Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model", *Nat.Rev.Drug Discov.* 3, 1: 27-41, (2004).
- Park, B. W., Kim, K. S., Heo, M. K., Ko, S. S., Hong, S. W., Yang, W. I., Kim, J. H., Kim, G. E., and Lee, K. S. "Expression of estrogen receptor-beta in normal mammary and tumor tissues: is it protective in breast carcinogenesis?", *Breast Cancer Res.Treat.* 80, 1: 79-85, (2003).
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. "Global cancer statistics, 2002", *CA Cancer J.Clin.* 55, 2: 74-108, (2005).
- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., and Leitman, D. C. "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest", *Cancer Res.* 64, 1: 423-428, (2004).
- Pearce, S. T. and Jordan, V. C. "The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer", *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 50, 1: 3-22, (2004).
- Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Walton, J., Hubbard, R. E., Thorsell, A. G., Li, Y. L., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. "Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen", *Structure* 9, 2: 145-153, (2001).

- Taylor, R. and Taguchi, K. "Tamoxifen for breast cancer chemoprevention: low uptake by high-risk women after evaluation of a breast lump", *Ann.Fam.Med.* 3, 3: 242-247, (2005).
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., and Dong, J. "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells", *Endocrinology* 146, 2: 624-632, (2005).
- Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members", *Annu.Rev.Biochem.* 63, 451-486, (1994).
- Ugwumadu, A. H., Carmichael, P. L., and Neven, P. "Tamoxifen and the female genital tract", *Int.J.Gynecol.Cancer* 8, 1: 6-15, (1998).
- Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Recchia, A. G., Musti, A. M., Picard, D., Ando, S., and Maggiolini, M. "The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells", *Mol.Endocrinol.* (2005).
- Wakeling, A. E., Dukes, M., and Bowler, J. "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential", *Cancer Res.* 51, 15: 3867-3873, (1991).
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., and Waterfield, M. "Cloning of the human estrogen receptor cDNA", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 23: 7889-7893, (1985).
- Webster, N. J., Green, S., Jin, J. R., and Chambon, P. "The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function", *Cell* 54, 2: 199-207, (1988).
- Welshons, W. V. and Jordan, V. C. "Adaptation of estrogen-dependent MCF-7 cells to low estrogen (phenol red-free) culture", *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 23, 12: 1935-1939, (1987).

FIGURES LEGENDS

Figure 1 : A) ER α mRNA abundance in uterine cancer cell lines studied in the presence and the absence of exogenous estrogens as determined by RT-PCR. Data analysis was performed by the Quantity One software and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. mRNAs results with EN-1078D corresponded to a significantly difference between the presence and absence of exogenous estrogens (* $P < 0.05$). B) ER α protein expression in each cancer cells in the presence and the absence of exogenous estrogens as determined by Western blot. One representative experiment out of 3 is shown. β -actin was used as a control to correct for loading.

Figure 2 : A) ER β mRNA abundance in each cell line studied in the presence and the absence of exogenous estrogens as determined by RT-PCR. Data analysis was performed by the Quantity One software and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments. B) ER β protein expression in each cancer cell in the presence and the absence of exogenous estrogens as determined by Western blot. One representative experiment out of 3 is shown. β -actin was used as a control to correct for loading.

Figure 3 : A) GPR30 mRNA abundance in each cell line studied in the presence and the absence of exogenous estrogens as determined by RT-PCR. B) REA mRNA abundance in each cells lines studied in the presence and the absence of exogenous estrogens as determined by RT-PCR. β -actin was used as a control to correct for loading. Data analysis was performed by the Quantity One software and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

Figure 4: Total Akt (A) and phospho-Akt (B) protein expression in each cancer cells in the presence and absence of exogenous estrogens as determined by Western blot. One representative experiment out of 4 is shown. β -actin was used as a control to correct for loading.

Figure 5 : Effect of 17β -estradiol on cell proliferation of HeLa, HEC-1-A, KLE (A) and (C) and RL-95-2, Ishikawa and EN-1078D (B) and (D) uterine cancer cell lines as determined by the conversion of MTT into a thiazolyl blue MTT-formazan. Treatments were performed as described in «Materials and Methods» in media with (A) and (B) and without exogenous estrogens (C) and (D) during 24 and 48 hours. Results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.

Figure 6 : Effect of 4-hydroxytamoxifen on cell proliferation in HeLa, HEC-1-A, KLE (A) and (C) and RL-95-2, Ishikawa and EN-1078D (B) and (D) uterine cancer cell lines as determined by the conversion of MTT into a thiazolyl blue MTT-formazan. Treatments were performed as described in «Materials and Methods» in media with (A) and (B) and without exogenous estrogens (C) and (D) during 24 and 48 hours. Results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.

Figure 7 : Effect of raloxifene on cell proliferation in HeLa, HEC-1-A, KLE (A) and (C) and RL-95-2, Ishikawa and EN-1078D (B) and (D) uterine cancer cell lines as determined by the conversion of MTT into a thiazolyl blue MTT-formazan. Treatments were performed as described in «Materials and Methods» in media with (A) and (B) and without exogenous estrogens (C) and (D) during 24 and 48 hours. Results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.

Figure 8 : Effect of ICI 182 780 on cell proliferation in HeLa, HEC-1-A, KLE (A) and (C) and RL-95-2, Ishikawa and EN-1078D (B) and (D) uterine cancer cell

lines as determined by the conversion of MTT into a thiazolyl blue MTT-formazan. Treatments were performed as described in «Materials and Methods» in media with (A) and (B) and without exogenous estrogens (C) and (D) during 24 and 48 hours. Results represent mean \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.

Figure 9 : A) ER α binding affinity of 17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, raloxifen and ICI 182 780. (B) Same as in (A) but with the ER β . 17 β -estradiol is represented by a square, 4-hydroxytamoxifen by an inverted triangle, raloxifen by a lozenge and ICI 182 780 by a triangle. Data represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

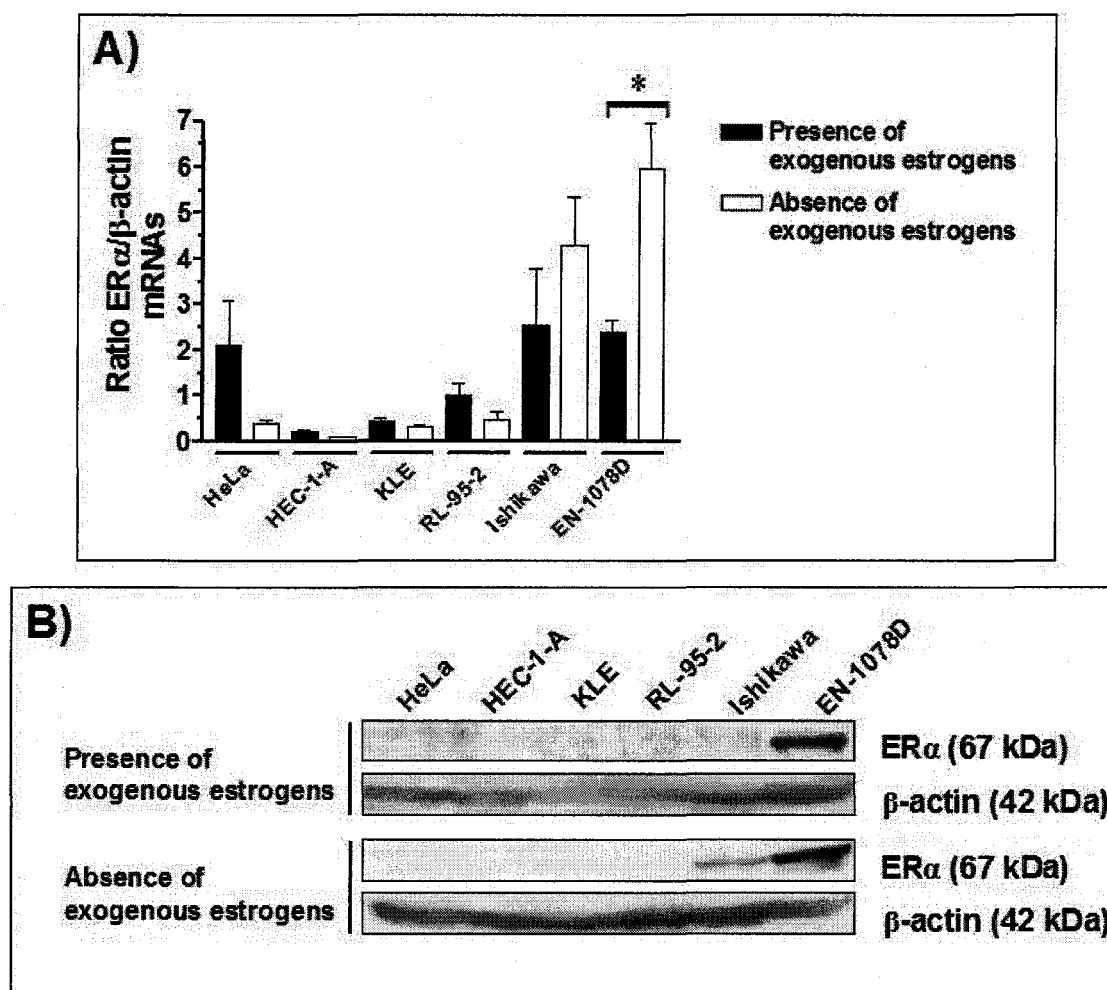


FIGURE 1

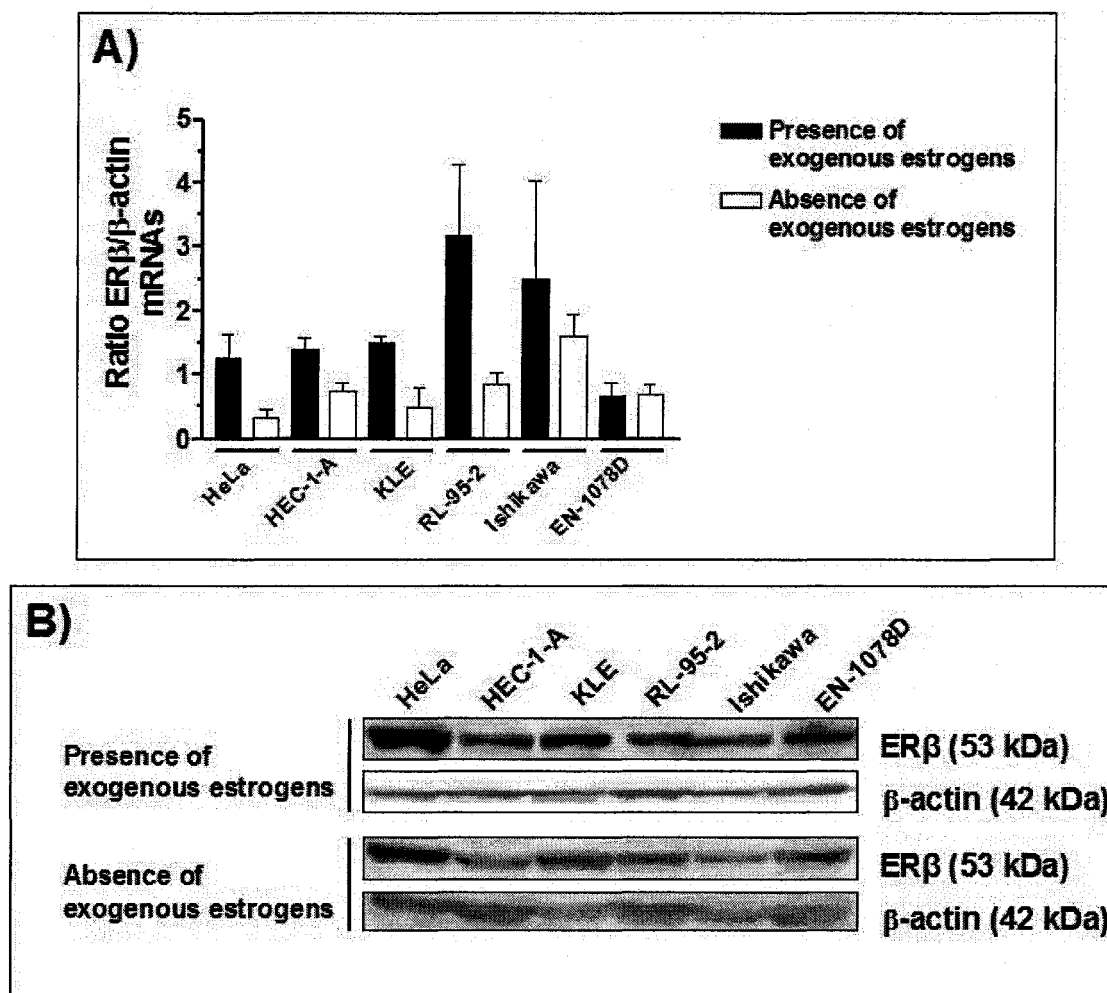


FIGURE 2

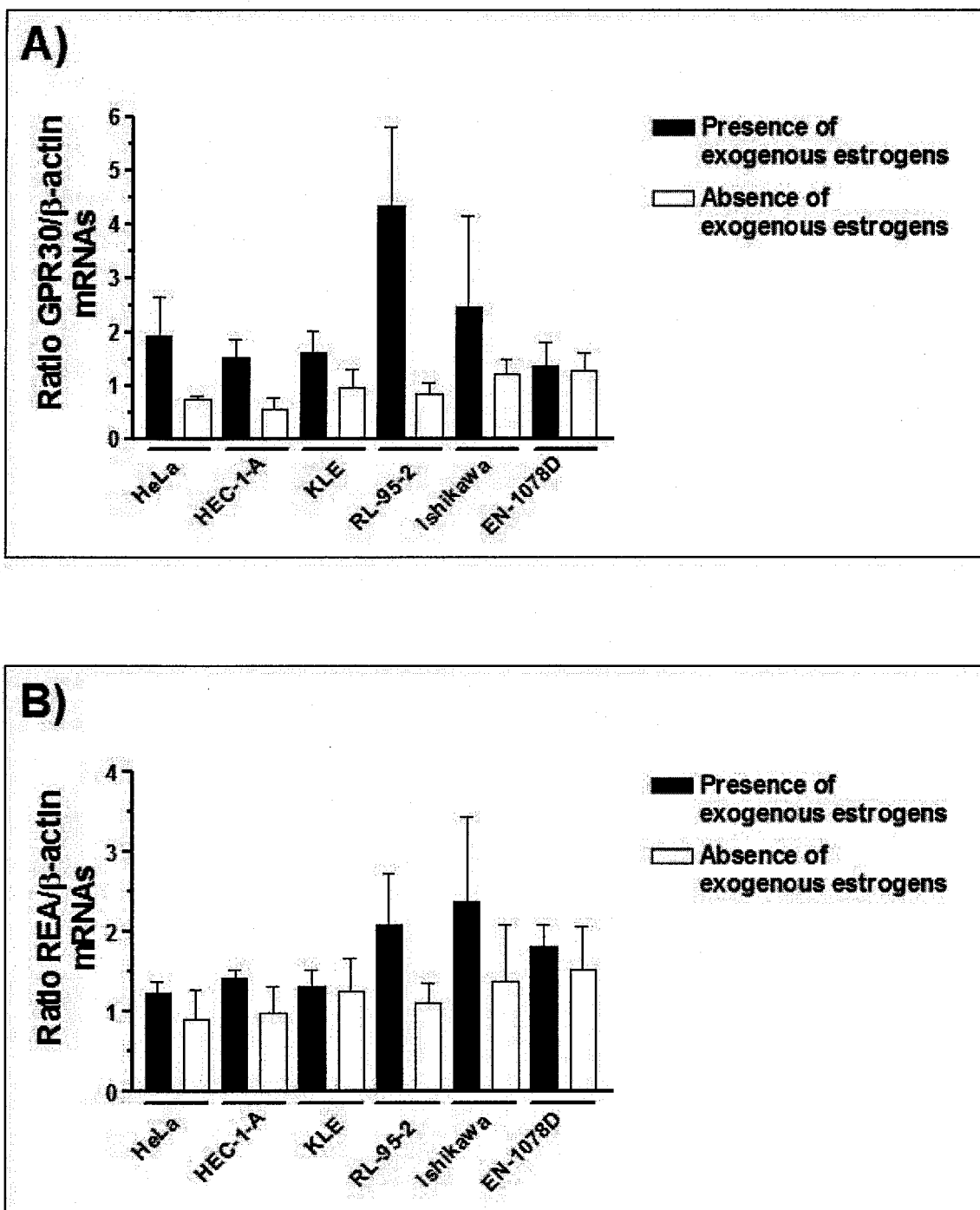


FIGURE 3

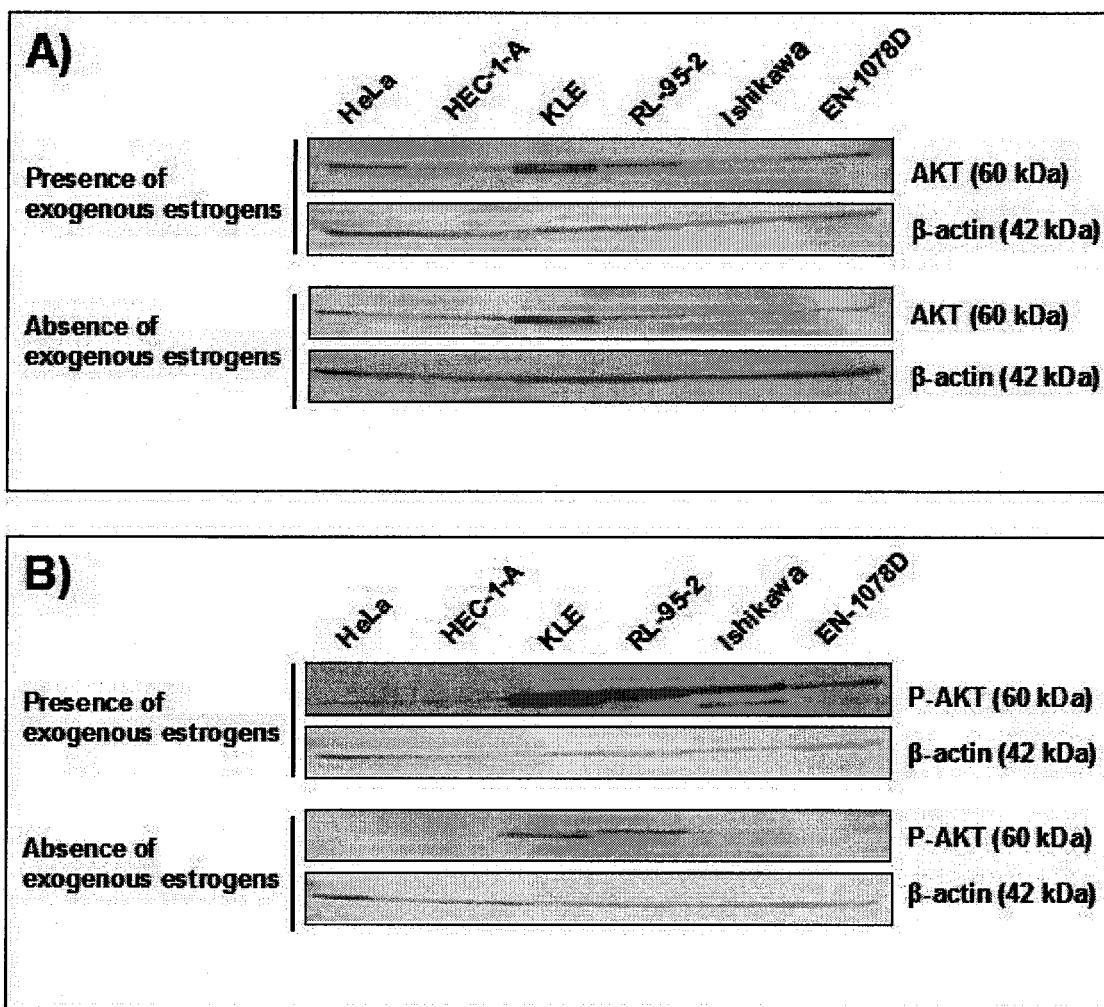


FIGURE 4

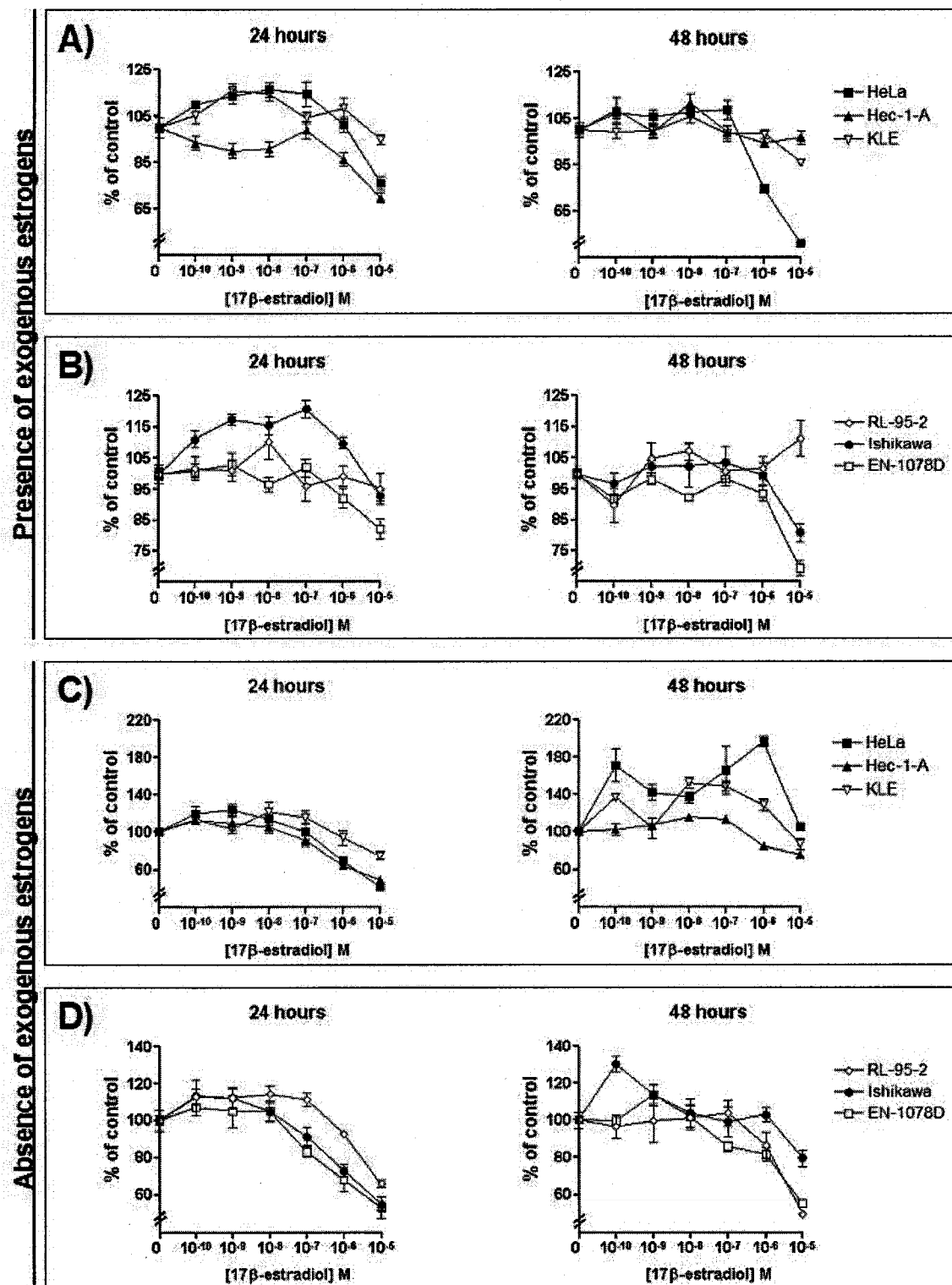


FIGURE 5

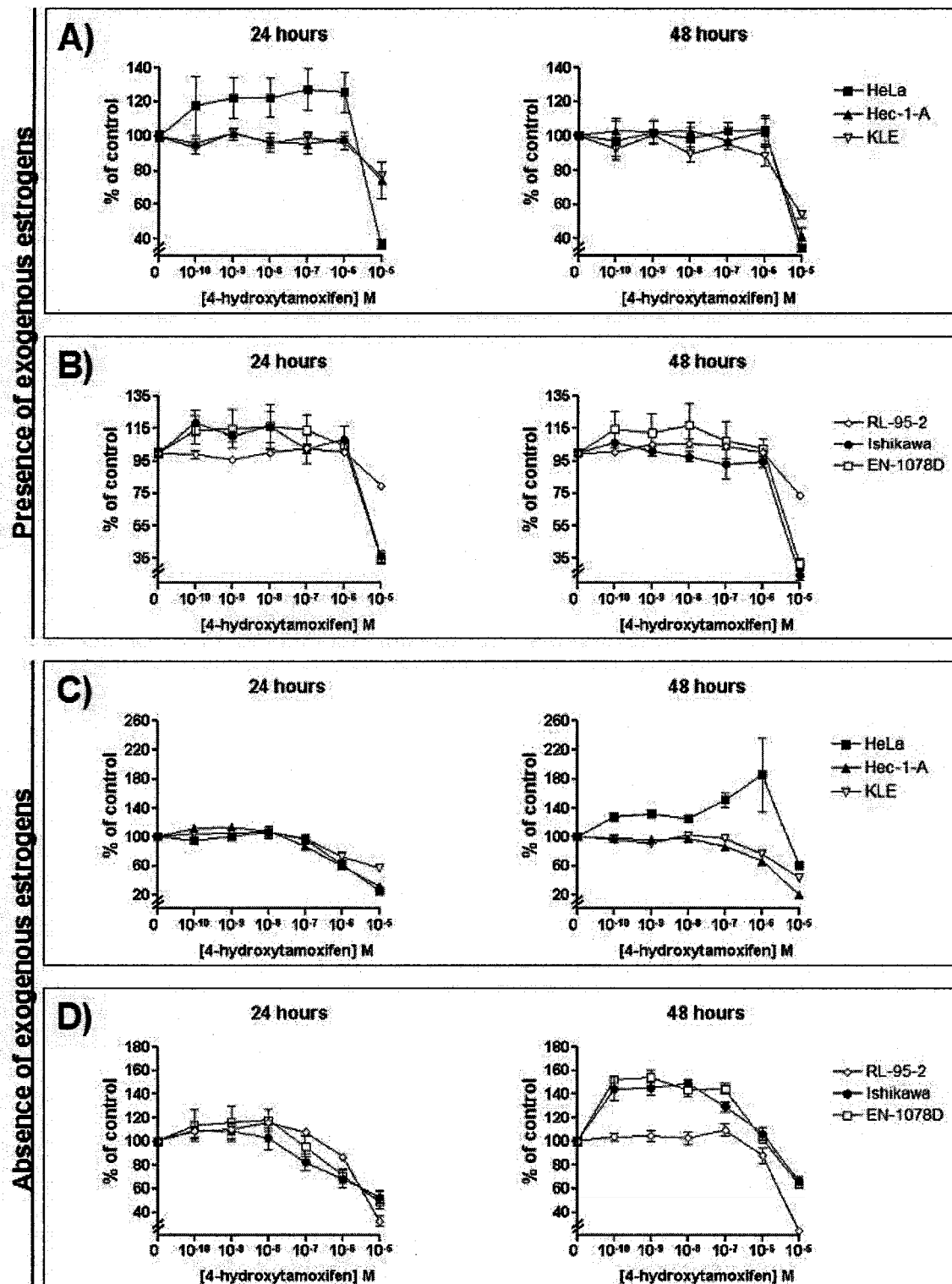


FIGURE 6

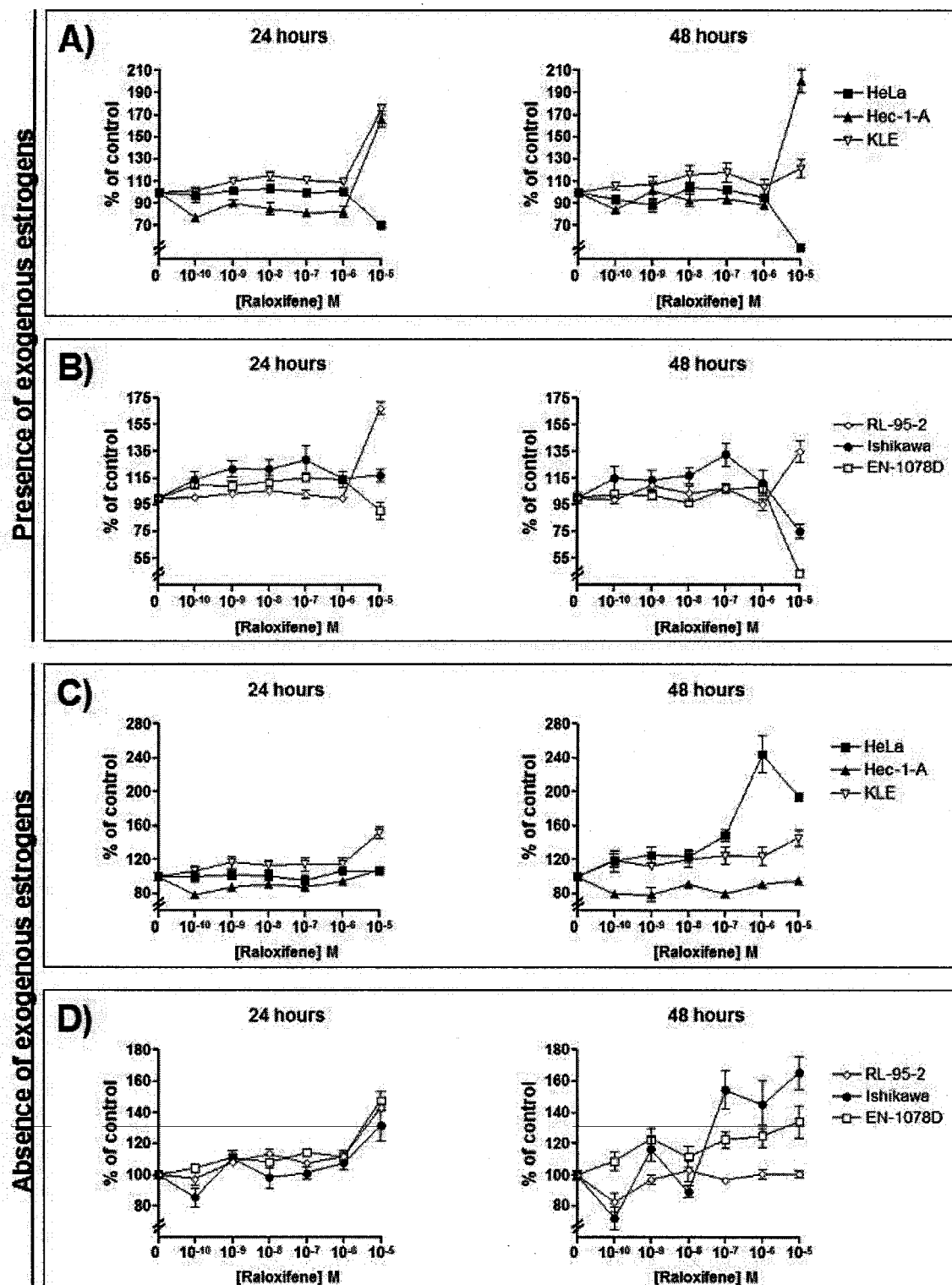


FIGURE 7

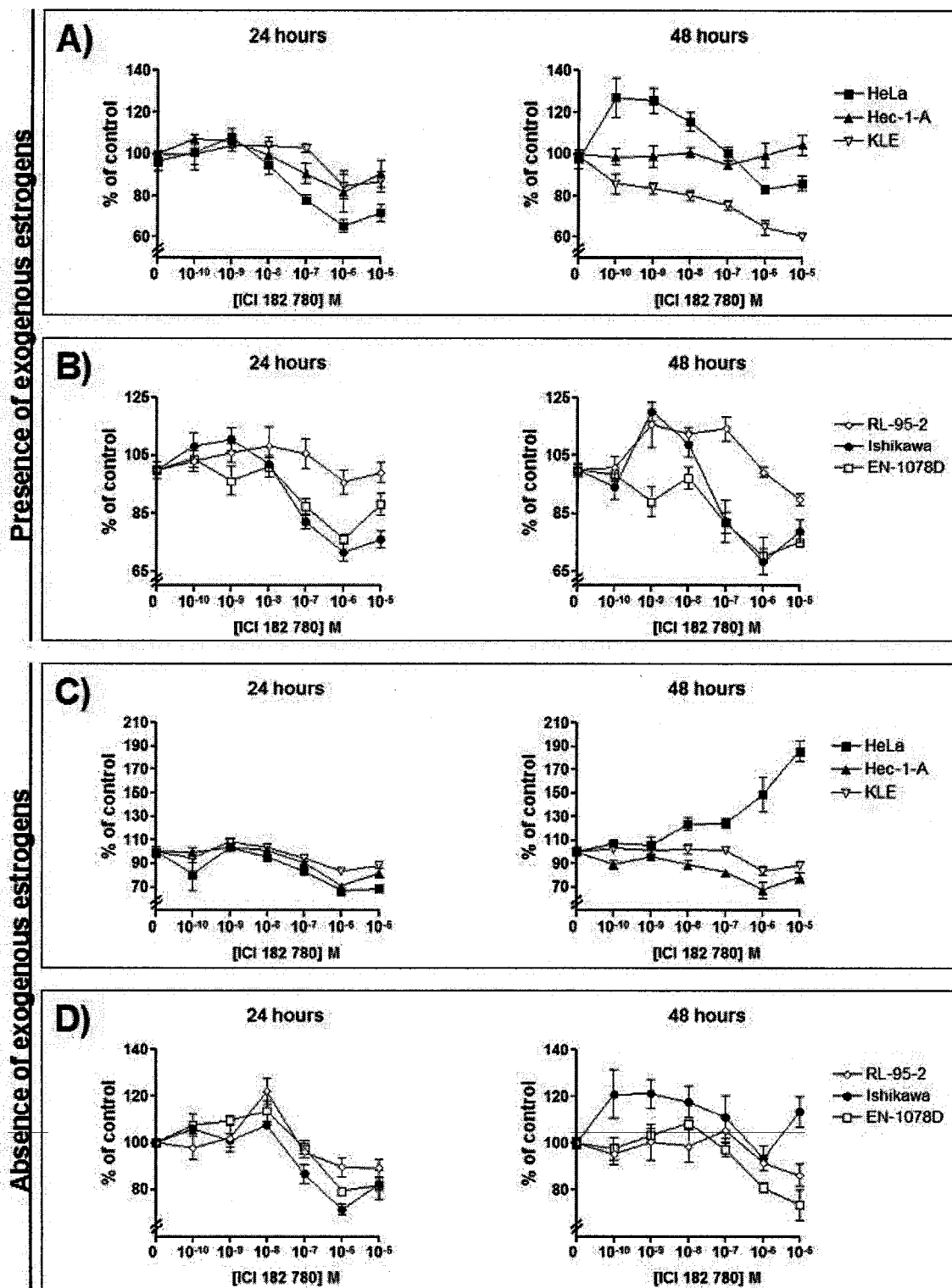


FIGURE 8

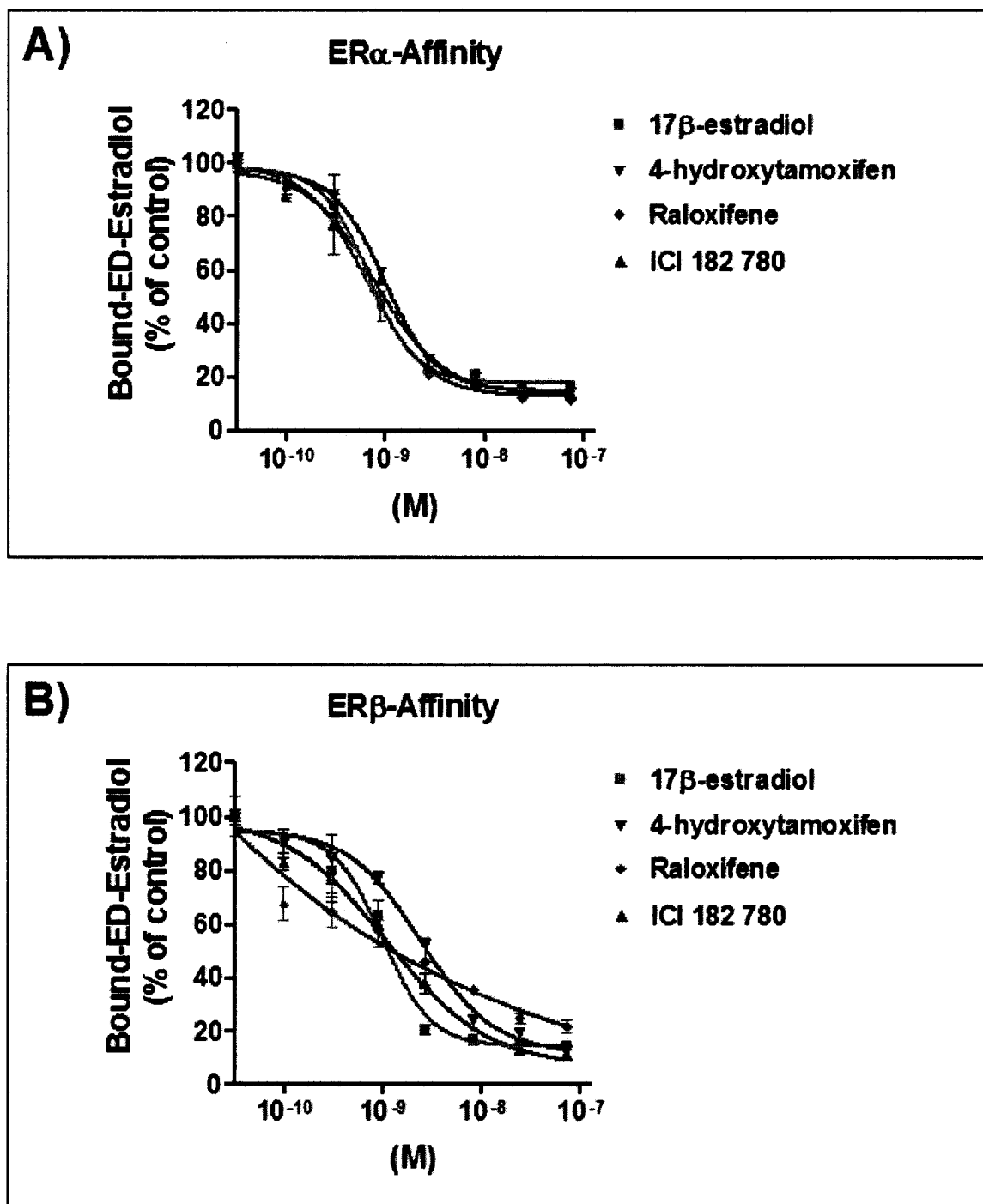


FIGURE 9

CHAPITRE III

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES FUTURES

L'avancement des connaissances sur les estrogènes a permis le développement de composés aux propriétés anti-oestrogéniques (anti-estrogènes) à des fins thérapeutiques contre des pathologies reliées aux estrogènes. Certains de ces composés sont des antagonistes partiels des estrogènes qui dépendent du tissu cible alors que d'autres composés n'ont qu'une activité purement anti-oestrogénique indépendamment du tissu (purs anti-estrogènes) (Katzenellenbogen 1996; MacGregor et Jordan 1998). Les anti-estrogènes partiels peuvent être utilisés pour contrer des maladies tant pour leurs propriétés oestrogéniques que anti-oestrogéniques. Parmi les anti-estrogènes qui sont maintenant approuvés et utilisés couramment pour la prévention et/ou le traitement d'affections reliées aux estrogènes figurent le tamoxifène, le raloxifène et le ICI 182 780. Le tamoxifène est un antagoniste des estrogènes au niveau du sein et un agoniste au niveau de l'utérus et des os (Katzenellenbogen et al. 1997). Il est fréquemment prescrit en prévention et en traitement du cancer du sein (Fisher et al. 1998; MacGregor et Jordan 1998; Taylor et Taguchi 2005; Ugwumadu et al. 1998). Le tamoxifène à l'intérieur du corps humain est métabolisé en 4-hydroxytamoxifène qui, lui, possède les mêmes propriétés agonistes et antagonistes des estrogènes que le tamoxifène (Jordan et al. 1977). Comme agoniste des estrogènes au niveau de l'utérus, le tamoxifène augmente le risque de développer un cancer utérin (Fisher et al. 1994; Fornander et al. 1989). Le raloxifène est antagoniste des estrogènes au niveau du sein et de l'utérus alors qu'il est agoniste au niveau des os (Cummings et al. 1999; Delmas et al. 1997). Il est présentement utilisé en prévention et en traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées (Delmas et al. 1997; Goldstein 2001). Le ICI 182 780 est un pur anti-estrogène utilisé dans le traitement du cancer du sein localement avancé, métastasé ou résistant au tamoxifène (de Cremoux et al. 2004; Howell et Robertson 1995). De par leurs propriétés antagonistes des estrogènes au niveau de l'utérus, le raloxifène et le ICI 182 780 n'influent pas sur le facteur de risque du cancer de cet organe (Cummings et al. 1999; Delmas et al. 1997; Wakeling et al. 1991). Malgré son utilisation courante pour le cancer du sein, les effets du tamoxifène demeurent encore peu connus au niveau du cancer de l'utérus. Ainsi, dans la présente étude, nous avons examiné les effets du 17β -

oestradiol (estrogène le plus abondant chez la femme (Heffner 2003)) et du 4-hydroxytamoxifène (métabolite actif du tamoxifène (Jordan et al. 1977)), en comparaison avec ceux du raloxifène et du ICI 182 780 sur la prolifération cellulaire de six lignées cellulaires cancéreuses utérines (HeLa, HEC-1-A, KLE, RL-95-2, Ishikawa et EN-1078D) sous deux conditions de culture cellulaire, soient en présence ou en absence d'estrogènes.

En 1986, l'équipe de Berthois et al. découvre que le rouge de phénol, un indicateur de pH présent dans la majorité des milieux de culture, possède des propriétés oestrogéniques sur le récepteur à l'estrogène. Suite à cette découverte, cette équipe suggère de considérer le rouge de phénol dans toutes les études en culture cellulaire avec des lignées hormono-dépendantes. D'autres équipes de chercheurs ont, par la suite, étudié les effets du rouge de phénol chez différents types cellulaires : lignées cancéreuses du sein (Glover et al. 1988) et cellules endométriales humaines normales (David et al. 1990). Par contre, aucune étude sur le rouge de phénol n'a encore été effectuée sur des lignées cellulaires cancéreuses utérines. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux effets du rouge de phénol, mais aussi à ceux des stéroïdes dans le sérum. Nous avons privilégié deux conditions de culture cellulaire pour déterminer leurs effets : l'une en présence d'estrogènes, c'est-à-dire en présence de rouge de phénol et de sérum standard, et l'autre en absence d'estrogènes, c'est-à-dire en absence de rouge de phénol et en présence de sérum traité au charbon-dextran. Nous avons soumis toutes nos expériences à ces deux conditions de culture cellulaire afin de bien différencier leur impact sur les lignées cellulaires cancéreuses de l'utérus. De cette façon, nous pouvions aussi observer l'influence de ces deux conditions de culture sur l'action des quatre composés à l'étude. Nous avons observé des différences entre la présence et l'absence d'estrogènes dans la majorité de nos résultats de prolifération cellulaire avec les six lignées cellulaires cancéreuses utérines en plus d'avoir observé un changement dans l'expression du ER α chez la lignée Ishikawa. Nos résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Berthois et al. (1986), de Glover et al. (1988) chez des cellules cancéreuses du sein et, aussi, avec l'équipe de David et al. (1990) chez des cellules endométriales humaines normales. Tel que proposé par ces études, nos résultats aussi confirment

l'importance de considérer le rouge de phénol présent dans le milieu de culture ainsi que les stéroïdes du sérum dans toutes les études avec des cellules répondantes aux estrogènes. De plus, nous avons vu que l'activité de Akt a été significativement réduite en absence d'estrogènes, ce qui indique que le rouge de phénol et les stéroïdes peuvent influencer l'activité de cette voie de prolifération et de survie cellulaire. Nous avons aussi observé chez les lignées exprimant le phénotype sauvage de PTEN (HeLa et HEC-1-A) une faible expression de phospho-Akt en présence d'estrogènes et une perte de cette expression en absence d'estrogènes. Ainsi, nos résultats montrent l'importance dans le futur de considérer les effets des estrogènes exogènes lors de l'étude de la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/PTEN/Akt. Nous avons démontré cette importance pour la première fois chez des cellules cancéreuses humaines de l'utérus.

Comme la plupart des effets des estrogènes sont véhiculés par le récepteur à l'estrogène (Gustafsson 1999), nous avons vérifié l'expression de ses deux isoformes au niveau de l'ARNm et au niveau protéique sous les deux conditions de culture cellulaire. Nous avons détecté l'expression du gène du ER α en ARNm chez toutes les lignées cellulaires en présence d'estrogènes alors qu'en absence d'estrogènes seulement les lignées Ishikawa et EN-1078D ont exprimé suffisamment cet isoforme. L'expression de la protéine du ER α a été observée chez la lignée EN-1078D avec une différence significative d'expression sous les deux conditions de culture cellulaire et, en absence d'estrogènes, seulement chez la lignée Ishikawa alors qu'aucune autre lignée cellulaire n'a exprimé cette protéine. Le gène du ER β , contrairement à celui du ER α , est exprimé chez les six lignées cancéreuses utérines tant en présence qu'en absence d'estrogènes. La protéine du ER β est aussi détectée chez toutes les lignées cellulaires à l'étude en présence et en absence d'estrogènes. Une production supérieure du ER β est observée chez la lignée HeLa comparativement aux autres lignées et ce, sous les deux conditions de culture cellulaire. Nos résultats concernant l'expression des deux isoformes du ER présentent des différences dans leurs niveaux d'expression lorsqu'ils sont comparés avec ceux d'autres études (Jana et al. 1999; Jones et al. 1999; Monje et Boland 2002; Vivacqua et al. 2005). Contrairement à nos résultats d'expression du ER au niveau protéique, ces études démontrent que les lignées HeLa (Monje et Boland 2002), HEC-1-

A (Jones et al. 1999) et Ishikawa (Vivacqua et al. 2005) expriment le ER α et le ER β alors que les lignées KLE et RL-95-2 expriment seulement l'isoforme α du ER (Jana et al. 1999). Comme nous l'avons observé nous-mêmes avec la lignée Ishikawa exprimant la protéine du ER α seulement en absence d'estrogènes, les conditions de culture cellulaire dans lesquelles sont soumises les lignées cellulaires cancéreuses peuvent avoir un impact sur l'expression du ER et c'est ce qui pourrait expliquer la différence entre nos résultats et ceux des autres études.

La voie génomique d'action des estrogènes nécessite généralement des co-régulateurs pour médier les effets des estrogènes (McKenna et al. 1999). Parmi les co-régulateurs découverts à ce jour, un seul possède une action spécifique pour le récepteur à l'estrogène et non pour certains autres récepteurs stéroïdiens ou non-stéroïdiens, le REA. Ce co-régulateur est un répresseur de la transcription des deux isoformes du ER (Montano et al. 1999). Nous avons caractérisé, pour la première fois, le REA chez les six lignées cellulaires cancéreuses utérines à l'étude. L'expression du REA au niveau de l'ARNm a été détectée chez toutes nos lignées cellulaires en présence et en absence d'estrogènes et ce, sans différence significative. Ainsi, il est possible que le REA joue un rôle dans les effets que les estrogènes et les anti-estrogènes médient chez ces six lignées cellulaires, mais d'autres recherches seront nécessaires pour le vérifier. L'inhibition de l'expression du REA en rendant son ARNm silencieux par la technique de « small interference RNA » (siRNA), par exemple, pourrait nous permettre de vérifier son implication dans le mécanisme d'action des estrogènes et des anti-estrogènes chez les six lignées cellulaires à l'étude. De plus, les niveaux de la protéine du REA chez les lignées cellulaires à l'étude devront être déterminés. Le REA pour moduler l'activité du ER, semble compétitionner avec le co-activateur des récepteurs stéroïdiens 1 (SRC-1) (Montano et al. 1999). SRC-1 augmente la médiation des estrogènes sur l'activité transcriptionnelle du ER de quatre à cinq fois. Il semble que cette augmentation par SRC-1 peut être supprimé par la co-expression du REA et ce, de façon dépendante de ses niveaux d'expression. C'est surtout à des niveaux élevés d'expression que le REA peut réduire la réponse face aux estrogènes. De plus, toujours à des niveaux élevés d'expression, le REA peut aussi favoriser le potentiel d'inhibition des anti-estrogènes

(Montano et al. 1999). Prochainement, il faudrait s'intéresser à l'expression de SRC-1 chez les six lignées cellulaires à savoir si ce co-activateur pourrait jouer un rôle dans les actions des anti-estrogènes.

Certaines actions des estrogènes n'utiliseraient pas le ER nucléaire tel que nous en connaissons les propriétés génomiques, mais utiliseraient plutôt un récepteur membranaire pour être effectuées (Norman et al. 2004). Cette voie d'action des estrogènes n'étant que très peu documentée, peu de molécules déterminantes dans cette médiation sont connues. Il semble que le GPR30, un récepteur membranaire de la famille des récepteurs couplés à une protéine G, soit capable de fixer les estrogènes et de médier leur effets à l'intérieur de certains types cellulaires (Carmeci et al. 1997; Thomas et al. 2005). L'expression de l'ARNm du GPR30 n'ayant jamais été déterminée au niveau des lignées cellulaires cancéreuses utérines à l'étude, nous en avons fait la caractérisation. Tant en présence qu'en absence d'estrogènes, nous avons détecté l'expression du GPR30 en ARNm chez les six lignées cellulaires cancéreuses de l'utérus de notre étude et ce, sans différence significative entre chaque lignée. L'expression du GPR30 chez les six lignées cellulaires suggère que ces lignées puissent exécuter des actions non-génomiques en plus de leurs actions génomiques. Dans le même sens, une étude très récente a démontré que le GPR30 participait à la médiation de la prolifération cellulaire par le 17β -oestradiol et le 4-hydroxytamoxifène chez les lignées HEC-1-A et Ishikawa (Vivacqua et al. 2005). Les auteurs de cette étude ont observé la présence de la protéine du GPR30 chez les lignées HEC-1-A et Ishikawa alors que nous l'avons observé en ARNm chez ces mêmes lignées. Ils ont démontré que le 17β -oestradiol et le 4-hydroxytamoxifène médiaient l'expression de c-fos, un proto-oncogène, pour favoriser la prolifération cellulaire. Ces auteurs suggèrent deux mécanismes d'action pour agir sur l'expression de c-fos : un impliquant le ER α et l'autre le GPR30 par le biais des voies de signalisation cellulaire de la PI 3-K et des « mitogen-activated protein kinase » (MAPK). Ainsi, il serait important dans un avenir proche de déterminer le rôle exact du GPR30 et des voies de signalisation cellulaire abordé précédemment dans les effets que nous avons observés avec le 17β -oestradiol, le

4-hydroxytamoxifène, le raloxifène et le ICI 182 780 chez les six lignées cellulaires utérines.

L'affinité de fixation au récepteur à l'estrogène est un indicateur de la capacité d'un composé à pouvoir agir par le biais du ER. Nous avons déterminé l'affinité de fixation du 17 β -oestradiol, du 4-hydroxytamoxifène, du raloxifène et du ICI 182 780 pour chaque isoforme du ER. Ces quatre composés ont une affinité très similaire se rapprochant de celle du 17 β -oestradiol pour le ER α . Pour le ER β , les composés ont tous une forte affinité près de celle du 17 β -oestradiol excepté le raloxifène qui a une affinité très faible de fixation pour cet isoforme. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Haskell 2003; Wakeling et al. 1991).

Les effets du 17 β -oestradiol, du 4-hydroxytamoxifène, du raloxifène et du ICI 182 780 ont été évalués au niveau de la prolifération cellulaire chez les six lignées cellulaires utérines par la méthode d'essais de prolifération cellulaire au MTT. Nous avons démontré que le 17 β -oestradiol et le 4-hydroxytamoxifène présentaient des similarités dans leur action sur la prolifération cellulaire des lignées cellulaires utérines. La majorité des lignées cellulaires présentent un patron de prolifération cellulaire biphasique, c'est-à-dire qu'elles prolifèrent à faibles doses alors qu'elles décroissent à fortes doses. Cette similarité d'action témoigne de l'activité agoniste du 4-hydroxytamoxifène au niveau du cancer de l'utérus tout comme c'est le cas sur l'utérus normal (Fisher et al. 1994; Fornander et al. 1989). Curieusement, malgré son affinité faible pour le ER β , le raloxifène a induit des effets sur toutes les lignées cellulaires utérines et non pas seulement sur celles qui possèdent le ER α . Chez la majorité des lignées cellulaires étudiées, le raloxifène a induit une augmentation importante de la prolifération cellulaire à fortes doses ce qui avait déjà été démontré avec les cellules Ishikawa (Boostanfar et al. 2003; Hibner et al. 2004). Étonnamment, c'est la lignée HeLa qui exprime seulement et fortement l'isoforme β du ER qui a été la plus influencée par le raloxifène. Ces résultats suggèrent que le raloxifène utilise un autre médiateur que le ER α pour effectuer ses effets chez certaines lignées cellulaires. Ainsi, il serait intéressant dans le futur de regarder l'affinité de tous les composés à l'étude, mais

surtout celle du raloxifène pour le GPR30 afin de vérifier si les effets de ce dernier pourraient être médiés par le GPR30. Le ICI 182 780 a exercé une action principalement antagoniste des estrogènes sur les cellules cancéreuses utérines tel qu'attendu de la part d'un pur anti-estrogène.

De manière plus approfondie, chaque lignée cellulaire a répondu d'une façon particulière aux composés et aux conditions de culture cellulaire auxquelles elles ont été soumises. Reprenons chaque lignée cellulaire cancéreuse utérine individuellement afin de mieux comprendre les actions exercées par les composés sur chacune d'elle.

La lignée EN-1078D, qui exprime fortement la protéine du ER α et de façon moindre celle du ER β , fût l'une des lignées cellulaires les plus affectées par les quatre composés de l'étude. Le ER α joue probablement un rôle important dans la sensibilité de cette lignée. Étonnamment, les cellules EN-1078D ont présenté un meilleur potentiel prolifératif en réponse aux quatre composés en absence d'estrogènes. Cela suggère que la prolifération cellulaire des cellules EN-1078D était déjà dans un état stimulé en présence d'estrogènes. Selon l'équipe de Berthois et al. (1986), la présence de rouge de phénol peut être suffisante pour affecter le niveau basal de réponse aux hormones et aussi le degré auquel l'ajout d'estrogènes exogènes est capable de stimuler des réponses au-dessus du niveau basal. Ainsi, le rouge de phénol a pu empêché l'observation de certains effets sur la prolifération cellulaire des cellules EN-1078D en présence d'estrogènes.

Contrairement à la lignée EN-1078D, peu de différences ont été observées avec la lignée Ishikawa sous la présence et l'absence d'estrogènes dans les effets du 17 β -oestradiol et des trois anti-estrogènes sur la prolifération cellulaire. Rappelons nous que les cellules Ishikawa ont exprimé les protéines du ER différemment sous les deux conditions de culture cellulaire : la protéine ER β a été observée sous les deux conditions alors que la protéine du ER α a été détectée seulement en absence d'estrogènes. Ainsi, l'expression de la protéine du ER α en absence d'estrogènes ne semble pas suffisante pour observer un changement pouvant être perçu dans la réponse aux composés étudiés.

L'induction de l'expression de la protéine du ER α en absence d'estrogènes chez la lignée cellulaire Ishikawa semble être une réponse au manque de nutriments. Les cellules de cette lignée tenteraient d'augmenter leur chance d'être stimulées à proliférer en enclenchant l'augmentation de leur ER α . Dans le même sens, une augmentation du niveau d'expression du ER α en absence d'estrogènes a déjà été observée chez une lignée cellulaire cancéreuse du sein : MCF-7 (Katzenellenbogen et al. 1987; Welshons et Jordan 1987). Comme le rôle exact du ER α n'a pas été défini dans nos résultats, de plus amples manipulations seront nécessaires pour y parvenir. Par exemple, l'utilisation d'un antagoniste spécifique de cet isoforme du ER ou l'inhibition de son expression par siRNA pourraient être deux méthodes appropriées pour nous aider à décrire son implication.

La lignée cellulaire cancéreuse HeLa ne produit pas le ER α , mais à l'inverse produit fortement le ER β en comparaison avec les cinq autres lignées cellulaires à l'étude. Cette lignée est capable de proliférer à de plus fortes doses de composés que les autres lignées ce qui suggère que le ER β favorise la prolifération cellulaire. À ce jour, le rôle du ER β est très peu défini au niveau du cancer de l'utérus. Comme nous l'avons vu en introduction, la présence du ER α est dominante sur celle du ER β sur l'utérus normal (Gustafsson 1999; Pearce et Jordan 2004) alors qu'au niveau des lignées cellulaires cancéreuses que nous avons étudiées, nous avons observé une prédominance de la part du ER β en comparaison avec le ER α . Ainsi, lors de la carcinogénèse, il pourrait y avoir un changement dans le ratio ER α /ER β pour favoriser la prolifération cellulaire. Comme le ER β est augmenté, celui-ci possède probablement des propriétés favorisant la prolifération cellulaire. Par contre, au niveau du cancer du sein, le rôle du ER β serait plutôt protecteur contre la carcinogénèse et donc sur la prolifération cellulaire comme observé avec la lignée MCF-7 (Paruthiyil et al. 2004) et aussi de par la réduction de ses niveaux d'expression dans le développement de ce cancer (Park et al. 2003). D'autres investigations sur le ER β seront nécessaires pour nous permettre de mieux définir son rôle exact chez des lignées cellulaires cancéreuses de l'utérus. Subséquemment, les

mêmes expériences qu'abordées précédemment pour définir le rôle du ER α pourraient s'appliquer au niveau du ER β afin de pouvoir identifier son rôle.

Les lignées cellulaires cancéreuses utérines HEC-1-A, KLE, RL-95-2 sont aussi influencées par le 17 β -oestradiol, le 4-hydroxytamoxifène, le raloxifène et le ICI 182 780, mais elles sont plus résistantes aux anti-estrogènes que les autres lignées cellulaires. Aucune des lignées cellulaires HEC-1-A, KLE et RL-95-2 n'expriment la protéine du ER α alors qu'elles expriment toutes le GPR30, le REA et la protéine du ER β . Étonnamment, les caractéristiques de ces trois lignées cellulaires sont communes à celles de la lignée HeLa et, cette dernière lignée, n'est pas résistante aux composés et réagit complètement différemment de ces trois lignées cellulaires. Certaines voies de signalisation cellulaire pourraient expliquer la résistance que nous avons observée. Par exemple, il a déjà été démontré que la protéine Akt de la voie de la PI 3-K était impliquée dans le développement d'une résistance à la cisplatine chez les cellules KLE (Gagnon et al. 2004). Prochainement, il faudra investiguer la voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt avec des inhibiteurs de celle-ci afin de vérifier son implication dans le mécanisme de résistance que nous avons observé avec les lignées cellulaires HEC-1-A, KLE et RL-95-2.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que les deux isoformes du ER, le ER α et le ER β , ont un rôle à jouer dans les effets engendrés par le 17 β -oestradiol, le 4-hydroxytamoxifène, le raloxifène et le ICI 182 780 sans être les seuls acteurs dans l'action de ces composés. Le GPR30 et le REA, qui ont été mesurés pour la première fois chez certaines lignées, pourraient avoir une grande importance dans les effets que nous avons obtenus et leur rôle devra être mieux défini. Nous avons observé que l'action du 4-hydroxytamoxifène était agoniste du 17 β -oestradiol chez les six lignées cancéreuses à l'étude tout comme c'est le cas sur l'utérus normal. Pour leur part, le raloxifène et le ICI 182 780 ont eu une action principalement antagoniste des estrogènes sur les lignées cancéreuses à l'étude. Finalement, nous avons confirmé l'importance de considérer les estrogènes exogènes lors d'études en lien avec les estrogènes chez des lignées cancéreuses de l'utérus.

Afin de poursuivre les recherches que nous avons entamées, d'autres expériences, en plus de celles déjà discutées, devront être effectuées pour nous permettre de mieux comprendre le mécanisme d'action du 4-hydroxytamoxifène, du raloxifène et du ICI 182 780 au niveau du cancer de l'utérus. Il faudrait vérifier l'action des trois anti-estrogènes à l'étude sur les deux isoformes du ER à savoir s'ils sont capables d'induire l'activation des ERE chez nos lignées cancéreuses de l'utérus. Ceci peut être vérifié par le biais de l'intégration, dans les lignées cellulaires à l'étude, d'un plasmide contenant la séquence des ERE et un gène rapporteur comme la luciférase, par exemple. Comme abordé précédemment, certaines voies de signalisation cellulaire pourraient être impliquées dans les actions du 17 β -oestradiol et des trois anti-estrogènes étudiés ainsi, des inhibiteurs de voies de signalisation cellulaire devraient être utilisés pour le vérifier. D'autres essais de prolifération cellulaire au MTT devront être fait sous des combinaisons de chacun des anti-estrogènes avec le 17 β -oestradiol afin d'observer leur action sous une compétition avec le ligand naturel du ER. Finalement, nos recherches devront éventuellement être poursuivies avec un modèle plus rapproché de la femme comme des biopsies humaines, par exemple.

Dans l'espoir qu'un jour on puisse enrayer les cas de cancers endométriaux engendrés par le tamoxifène, il devient urgent de trouver des moyens pour arrêter leur développement. Malheureusement, il reste encore beaucoup à faire pour augmenter notre compréhension du mécanisme d'action du tamoxifène. C'est avec des études comme celle-ci mais aussi d'autres qui y sont reliées que nous pourrons à plus long terme réussir à développer des stratégies pour empêcher les effets du tamoxifène au niveau du cancer de l'utérus. Un jour, peut-être, différentes thérapies plus ciblées pour chaque génotype des patientes pourront être administrées aux femmes traitées avec le tamoxifène. Sous forme de cocktail de médicaments, le tamoxifène pourrait être administré avec un autre composé qui bloquerait l'effet agoniste du tamoxifène au niveau de l'utérus. Si l'on découvre que l'action agoniste du tamoxifène est médié par une certaine voie de signalisation cellulaire, par exemple, on pourrait administrer un inhibiteur de cette voie. Les débouchés d'études comme la nôtre ne visent pas seulement le traitement du cancer de l'utérus, mais ils visent aussi le traitement d'autres

pathologies reliées aux estrogènes. Prochainement, il sera peut-être possible de développer un traitement avec un anti-estrogène idéal qui serait bénéfique pour l'ensemble du corps humain, c'est-à-dire qu'il posséderait les propriétés agonistes des effets bénéfiques et les propriétés antagonistes des effets néfastes des estrogènes pour le corps humain. D'ici là, il faut garder en tête, malgré son rôle dans le développement d'un cancer de l'utérus, que le tamoxifène est très efficace contre le cancer du sein et que ses bénéfices surpassent ses effets néfastes.

BIBLIOGRAPHIE

- American cancer society, Inc. "All about endometrial cancer", www.cancer.org, (2005).
- Barnes, D. and Sato, G. "Serum-free cell culture: a unifying approach", *Cell* 22, 3: 649-655, (1980).
- Beato, M. "Gene regulation by steroid hormones", *Cell* 56, 3: 335-344, (1989).
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., and Katzenellenbogen, B. S. "Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 8: 2496-2500, (1986).
- Bindal, R. D., Carlson, K. E., Katzenellenbogen, B. S., and Katzenellenbogen, J. A. "Lipophilic impurities, not phenolsulfonphthalein, account for the estrogenic activity in commercial preparations of phenol red", *J.Steroid Biochem.* 31, 3: 287-293, (1988).
- Bindal, R. D. and Katzenellenbogen, J. A. "Bis(4-hydroxyphenyl)[2-(phenoxy-sulfonyl)phenyl]methane: isolation and structure elucidation of a novel estrogen from commercial preparations of phenol red (phenolsulfonphthalein)", *J.Med.Chem.* 31, 10: 1978-1983, (1988).
- Bokhman, J. V. "Two pathogenetic types of endometrial carcinoma", *Gynecol.Oncol.* 15, 1: 10-17, (1983).
- Boostanfar, R., Amezcua, C. A., Tourgeman, D. E., Roy, S., Felix, J. C., and Stanczyk, F. Z. "Growth effects of raloxifene, estradiol, medroxy-progesterone acetate, and progesterone on human endometrial adenocarcinoma cells", *Fertil.Steril.* 79, 1: 223-225, (2003).
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions", *Nature* 348, 6297: 125-132, (1990).
- Boxen, I. and Tevaarwerk, G. J. "Charcoal as a phase separating agent in ligand assays: mechanism of action and the effect of dextran and various proteins on the adsorption of small molecules", *J.Immunoassay* 3, 1: 53-72, (1982).
- Brook, C. G. D. and Marshall, N. J. "Endocrinologie En bref..." Traduction de la 3e édition anglaise, 205-(1998).
- Brown, K. "Breast cancer chemoprevention: risk-benefit effects of the antioestrogen tamoxifen", *Expert.Opin.Drug Saf* 1, 3: 253-267, (2002).
- Butt, A. J., McNeil, C. M., Musgrove, E. A., and Sutherland, R. L. "Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential

- roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E", *Endocr.Relat Cancer* 12 Suppl 1, S47-S59, (2005).
- Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., and Weigel, R. J. "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer", *Genomics* 45, 3: 607-617, (1997).
- Chen, J. D. "Steroid/nuclear receptor coactivators", *Vitam.Horm.* 58, 391-448, (2000).
- Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S., and Parker, M. G. "Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA", *J.Biol.Chem.* 272, 32: 19858-19862, (1997).
- Cummings, S. R., Eckert, S., Krueger, K. A., Grady, D., Powles, T. J., Cauley, J. A., Norton, L., Nickelsen, T., Bjarnason, N. H., Morrow, M., Lippman, M. E., Black, D., Glusman, J. E., Costa, A., and Jordan, V. C. "The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation", *JAMA* 281, 23: 2189-2197, (1999).
- Darbre, P., Yates, J., Curtis, S., and King, R. J. "Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture", *Cancer Res.* 43, 1: 349-354, (1983).
- David, J. F., Marques, B., Maisongrosse, V., Jozan, S., and Mazabrey, D. "Weak direct proliferative action of estradiol on human endometrial cells in culture", *Bull.Assoc.Anat.* 74, 224: 51-55, (1990).
- de Cremoux, P., Dieras, V., Poupon, M. F., Magdelenat, H., Sigal-Zafrani, B., Fourquet, A., and Pierga, J. Y. "Tamoxifen and aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in menopausal women: pharmacological and clinical aspects", *Bull.Cancer* 91, 12: 917-927, (2004).
- DeFriend, D. J., Howell, A., Nicholson, R. I., Anderson, E., Dowsett, M., Mansel, R. E., Blamey, R. W., Bundred, N. J., Robertson, J. F., Saunders, C., and . "Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer", *Cancer Res.* 54, 2: 408-414, (1994).
- Deligdisch, L. and Holinka, C. F. "Endometrial carcinoma: two diseases?", *Cancer Detect.Prev.* 10, 3-4: 237-246, (1987).
- Delmas, P. D., Bjarnason, N. H., Mitlak, B. H., Ravoux, A. C., Shah, A. S., Huster, W. J., Draper, M., and Christiansen, C. "Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women", *N.Engl.J.Med.* 337, 23: 1641-1647, (1997).

- Dhanasekaran, N., Heasley, L. E., and Johnson, G. L. "G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis", *Endocr.Rev.* 16, 3: 259-270, (1995).
- Dunn, B. K. and Ford, L. G. "From adjuvant therapy to breast cancer prevention: BCPT and STAR", *Breast J.* 7, 3: 144-157, (2001).
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group "Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women.", *Lancet* 339, 8785: 71-85, (1992).
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group "Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials.", *Lancet* 351, 9114: 1451-1467, (1998).
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., and Gustafsson, J. A. "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern", *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, 12: 4258-4265, (1997).
- Evans, R. M. "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily", *Science* 240, 4854: 889-895, (1988).
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., and Frackelton, A. R., Jr. "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF", *Mol.Endocrinol.* 14, 10: 1649-1660, (2000).
- Fisher, B., Costantino, J. P., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., and Cronin, W. M. "Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14", *J.Natl.Cancer Inst.* 86, 7: 527-537, (1994).
- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., and Wolmark, N. "Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study", *J.Natl.Cancer Inst.* 90, 18: 1371-1388, (1998).
- Fornander, T., Rutqvist, L. E., Cedermark, B., Glas, U., Mattsson, A., Silfversward, C., Skoog, L., Somell, A., Theve, T., and Wilking, N. "Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers", *Lancet* 1, 8630: 117-120, (1989).
- Freedman, L. P. "Anatomy of the steroid receptor zinc finger region", *Endocr.Rev.* 13, 2: 129-145, (1992).

- Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., and Asselin, E. "AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells", *Gynecol.Oncol.* 94, 3: 785-795, (2004).
- Glover, J. F., Irwin, J. T., and Darbre, P. D. "Interaction of phenol red with estrogenic and antiestrogenic action on growth of human breast cancer cells ZR-75-1 and T-47-D", *Cancer Res.* 48, 13: 3693-3697, (1988).
- Goldstein, S. R. "The effect of SERMs on the endometrium", *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 949, 237-242, (2001).
- Gosden, J. R., Middleton, P. G., and Rout, D. "Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization", *Cytogenet.Cell Genet.* 43, 3-4: 218-220, (1986).
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., and Chambon, P. "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A", *Nature* 320, 6058: 134-139, (1986).
- Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA", *Science* 231, 4742: 1150-1154, (1986).
- Greenspan, F. S. and Gardner, D. G. "Basic and clinical endocrinology", 7e édition, Édition Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, États-Unis:976 pages, (2004).
- Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Miller, G. H., and Lewontin, R. C. "Analyse génétique moderne", 1ère édition de la version anglaise, Éditions De Boeck Université, Bruxelles, France:676 pages, (2001).
- Gustafsson, J. A. "Estrogen receptor beta-a new dimension in estrogen mechanism of action", *J.Endocrinol.* 163, 3: 379-383, (1999).
- Guzeloglu, Kayisli O., Kayisli, U. A., Luleci, G., and Arici, A. "In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent", *Biol.Reprod.* 71, 3: 714-721, (2004).
- Haskell, S. G. "Selective estrogen receptor modulators", *South.Med.J.* 96, 5: 469-476, (2003).
- Heffner, L. J. "Reproduction humaine", 1ère édition de la version anglaise, Édition De Boeck Université, 123 pages, (2003).
- Henderson, B. E., Ross, R., and Bernstein, L. "Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture", *Cancer Res.* 48, 2: 246-253, (1988).

- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C., and Casagrande, J. T. "Endogenous hormones as a major factor in human cancer", *Cancer Res.* 42, 8: 3232-3239, (1982).
- Hewitt, S. C., Deroo, B. J., and Korach, K. S. "Signal transduction. A new mediator for an old hormone?", *Science* 307, 5715: 1572-1573, (2005).
- Hibner, M., Magrina, J. F., Lefler, S. R., Cornella, J. L., Pizarro, A. R., and Loftus, J. C. "Effects of raloxifene hydrochloride on endometrial cancer cells in vitro", *Gynecol.Oncol.* 93, 3: 642-646, (2004).
- Howell, A., Downey, S., and Anderson, E. "New endocrine therapies for breast cancer", *Eur.J.Cancer* 32A, 4: 576-588, (1996).
- Howell, A. and Robertson, J. "Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer", *Lancet* 345, 8955: 989-990, (1995).
- Jana, N. R., Sarkar, S., Ishizuka, M., Yonemoto, J., Tohyama, C., and Sone, H. "Role of estradiol receptor-alpha in differential expression of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible genes in the RL95-2 and KLE human endometrial cancer cell lines", *Arch.Biochem.Biophys.* 368, 1: 31-39, (1999).
- Jones, C. D., Jevnikar, M. G., Pike, A. J., Peters, M. K., Black, L. J., Thompson, A. R., Falcone, J. F., and Clemens, J. A. "Antiestrogens. 2. Structure-activity studies in a series of 3-aryl-2-arylbenzo[*b*]thiophene derivatives leading to [6-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)benzo[*b*]thien-3-yl] [4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]-phenyl]methanone hydrochloride (LY156758), a remarkably effective estrogen antagonist with only minimal intrinsic estrogenicity", *J.Med.Chem.* 27, 8: 1057-1066, (1984).
- Jones, P. S., Parrott, E., and White, I. N. "Activation of transcription by estrogen receptor alpha and beta is cell type- and promoter-dependent", *J.Biol.Chem.* 274, 45: 32008-32014, (1999).
- Jordan, V. C., Collins, M. M., Rowsby, L., and Prestwich, G. "A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity", *J.Endocrinol.* 75, 2: 305-316, (1977).
- Katzenellenbogen, B. S. "Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways", *Biol.Reprod.* 54, 2: 287-293, (1996).
- Katzenellenbogen, B. S., Kendra, K. L., Norman, M. J., and Berthois, Y. "Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens", *Cancer Res.* 47, 16: 4355-4360, (1987).
- Katzenellenbogen, B. S., Montano, M. M., Ediger, T. R., Sun, J., Ekena, K., Lazennec, G., Martini, P. G., McInerney, E. M., Delage-Mourroux, R., Weis, K., and

- Katzenellenbogen, J. A. "Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology", *Recent Prog.Horm.Res.* 55, 163-193, (2000).
- Katzenellenbogen, B. S., Montano, M. M., Ekena, K., Herman, M. E., and McInerney, E. M. "William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer", *Breast Cancer Res.Treat.* 44, 1: 23-38, (1997).
- Kilgore, L. C., Partridge, E. E., Alvarez, R. D., Austin, J. M., Shingleton, H. M., Noojin, F., III, and Conner, W. "Adenocarcinoma of the endometrium: survival comparisons of patients with and without pelvic node sampling", *Gynecol.Oncol.* 56, 1: 29-33, (1995).
- Klock, G., Strahle, U., and Schutz, G. "Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct", *Nature* 329, 6141: 734-736, (1987).
- Kraus, W. L., McInerney, E. M., and Katzenellenbogen, B. S. "Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 26: 12314-12318, (1995).
- Kufe, D., Pollock, R., Weichselbaum, R., Bast, R., Gansler, T., Holland, J., and Frei, E. "Cancer medicine 6", 6e édition, BC Decker Inc., Hamilton, Canada:2764 pages, (2003).
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J. A. "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta", *Endocrinology* 138, 3: 863-870, (1997).
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J. R., and Chambon, P. "Functional domains of the human estrogen receptor", *Cell* 51, 6: 941-951, (1987).
- Kumar, V., Green, S., Staub, A., and Chambon, P. "Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor", *EMBO J.* 5, 9: 2231-2236, (1986).
- Leake, R. E., Freshney, R. I., and Munir, I. "Steroid response in vivo and in vitro", *IRL Press*, 6: 205-235, (1987).
- Lodish, H. F. and Darnell, J. E. "Biologie moléculaire de la cellule", 3e édition de la version anglaise, De Boeck Université, Belgique:1344 pages, (1997).
- Losel, R. and Wehling, M. "Nongenomic actions of steroid hormones", *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 1: 46-56, (2003).
- MacGregor, J. I. and Jordan, V. C. "Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action", *Pharmacol.Rev.* 50, 2: 151-196, (1998).

- Maneschi, M., Maneschi, F., Geraci, P., Licata, M. D., Serruto, A., Attanasio, P., and Curcio, P. "Surgical pathological staging of endometrial carcinoma and results of treatment", *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* 13, 1 Suppl: 30-35, (1992).
- Marino, M., Acconcia, F., and Trentalance, A. "Biphasic estradiol-induced AKT phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells", *Mol.Biol.Cell* 14, 6: 2583-2591, (2003).
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology", *Endocr.Rev.* 20, 3: 321-344, (1999).
- Monje, P. and Boland, R. "Expression and cellular localization of naturally occurring beta estrogen receptors in uterine and mammary cell lines", *J.Cell Biochem.* 86, 1: 136-144, (2002).
- Montano, M. M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., and Katzenellenbogen, B. S. "An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12: 6947-6952, (1999).
- Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor", *FEBS Lett.* 392, 1: 49-53, (1996).
- Nadal, A., Ropero, A. B., Fuentes, E., and Soria, B. "The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear?", *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 12: 597-599, (2001).
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J. A. "Mechanisms of estrogen action", *Physiol Rev.* 81, 4: 1535-1565, (2001).
- Norman, A. W., Mizwicki, M. T., and Norman, D. P. "Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model", *Nat.Rev.Drug Discov.* 3, 1: 27-41, (2004).
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. "The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro", *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 243, 1: 122-126, (1998).
- Pappas, T. C., Gametchu, B., and Watson, C. S. "Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding", *FASEB J.* 9, 5: 404-410, (1995).
- Park, B. W., Kim, K. S., Heo, M. K., Ko, S. S., Hong, S. W., Yang, W. I., Kim, J. H., Kim, G. E., and Lee, K. S. "Expression of estrogen receptor-beta in normal mammary and tumor tissues: is it protective in breast carcinogenesis?", *Breast Cancer Res.Treat.* 80, 1: 79-85, (2003).

- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. "Global cancer statistics, 2002", *CA Cancer J.Clin.* 55, 2: 74-108, (2005).
- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., and Leitman, D. C. "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest", *Cancer Res.* 64, 1: 423-428, (2004).
- Pearce, S. T. and Jordan, V. C. "The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer", *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 50, 1: 3-22, (2004).
- Pietras, R. J. and Szego, C. M. "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells", *Nature* 265, 5589: 69-72, (1977).
- Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Walton, J., Hubbard, R. E., Thorsell, A. G., Li, Y. L., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. "Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen", *Structure* 9, 2: 145-153, (2001).
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., and Levin, E. R. "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells", *Mol.Endocrinol.* 13, 2: 307-319, (1999).
- Revelli, A., Massobrio, M., and Tesarik, J. "Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues", *Endocr.Rev.* 19, 1: 3-17, (1998).
- Rollerova, E. and Urbancikova, M. "Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (Review)", *Endocr.Regul.* 34, 4: 203-218, (2000).
- Santen, R. J., Manni, A., Harvey, H., and Redmond, C. "Endocrine treatment of breast cancer in women", *Endocr.Rev.* 11, 2: 221-265, (1990).
- Sherman, M. E., Sturgeon, S., Brinton, L., and Kurman, R. J. "Endometrial cancer chemoprevention: implications of diverse pathways of carcinogenesis", *J.Cell Biochem.Suppl* 23, 160-164, (1995).
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., and Greene, G. L. "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen", *Cell* 95, 7: 927-937, (1998).
- Shibata, H., Spencer, T. E., Onate, S. A., Jenster, G., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. "Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action", *Recent Prog.Horm.Res.* 52, 141-164, (1997).
- Société canadienne du cancer "Cancer de l'utérus : Ce que vous devez savoir", www.cancer.ca, (2004).

- Sprang, S. R. "G protein mechanisms: insights from structural analysis", *Annu.Rev.Biochem.* 66, 639-678, (1997).
- Taylor, R. and Taguchi, K. "Tamoxifen for breast cancer chemoprevention: low uptake by high-risk women after evaluation of a breast lump", *Ann.Fam.Med.* 3, 3: 242-247, (2005).
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., and Dong, J. "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells", *Endocrinology* 146, 2: 624-632, (2005).
- Tortora, G. J. and Grabowski, S. R. "Principes d'anatomie et de physiologie", 9e édition de la version anglaise, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Saint-Laurent, Canada:1121 pages, (2001).
- Tsai, E. M., Wang, S. C., Lee, J. N., and Hung, M. C. "Akt activation by estrogen in estrogen receptor-negative breast cancer cells", *Cancer Res.* 61, 23: 8390-8392, (2001).
- Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members", *Annu.Rev.Biochem.* 63, 451-486, (1994).
- Ugwumadu, A. H., Carmichael, P. L., and Neven, P. "Tamoxifen and the female genital tract", *Int.J.Gynecol.Cancer* 8, 1: 6-15, (1998).
- van Biesen, T., Luttrell, L. M., Hawes, B. E., and Lefkowitz, R. J. "Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors", *Endocr.Rev.* 17, 6: 698-714, (1996).
- Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Recchia, A. G., Musti, A. M., Picard, D., Ando, S., and Maggiolini, M. "The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells", *Mol.Endocrinol.* (2005).
- Wakeling, A. E. and Bowler, J. "Novel antioestrogens without partial agonist activity", *J.Steroid Biochem.* 31, 4B: 645-653, (1988).
- Wakeling, A. E., Dukes, M., and Bowler, J. "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential", *Cancer Res.* 51, 15: 3867-3873, (1991).
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., and Waterfield, M. "Cloning of the human estrogen receptor cDNA", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 23: 7889-7893, (1985).
- Webster, N. J., Green, S., Jin, J. R., and Chambon, P. "The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function", *Cell* 54, 2: 199-207, (1988).

- Welshons, W. V. and Jordan, V. C. "Adaptation of estrogen-dependent MCF-7 cells to low estrogen (phenol red-free) culture", *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* 23, 12: 1935-1939, (1987).
- Wolf, D. M. and Jordan, V. C. "William L. McGuire Memorial Symposium. Drug resistance to tamoxifen during breast cancer therapy", *Breast Cancer Res.Treat.* 27, 1-2: 27-40, (1993).
- Ylikomi, T., Bocquel, M. T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. "Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors", *EMBO J.* 11, 10: 3681-3694, (1992).